

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**



**INTERACCIONES DE CÉLULAS DEL LINAJE  
OSTEOBLÁSTICO CON BIOMATERIALES. INFLUENCIA EN  
LAS COMUNICACIONES CELULARES MEDIADAS POR  
FACTORES SOLUBLES**

**LARA CRESPO GARCÍA**

**MADRID, 2015**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**INTERACCIONES DE CÉLULAS DEL LINAJE OSTEoblástico CON  
BIOMATERIALES. INFLUENCIA EN LAS COMUNICACIONES  
CELULARES MEDIADAS POR FACTORES SOLUBLES**

Memoria presentada por Lara Crespo García,  
Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor

Directora  
Dra. Nuria E. Vilaboa Díaz

Hospital Universitario la Paz, IdiPAZ  
Madrid, 2015



**NURIA E. VILABOA DÍAZ**, Doctora en Farmacia, Investigadora del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

**CERTIFICA:**

Que Lara Crespo García, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “Interacciones de células del linaje osteoblástico con biomateriales. Influencia en las comunicaciones celulares mediadas por factores solubles”, que presenta como Tesis Doctoral.

Madrid, 8 de enero de 2015

Nuria E. Vilaboa Díaz



Este trabajo se ha llevado a cabo en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz, gracias a la financiación concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MAT2009-14695-C04-02), Ministerio de Economía y Competitividad (MAT2012-37736-C05-05), Instituto de Salud Carlos III (FIS PI12/01698) y CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN).





*A mis padres*  
*A mis abuelos*



*“El verdadero heroísmo consiste en convertir  
los sueños en realidades y las ideas en hechos”*

*Alfonso Daniel Rodríguez Castelao*



## ***AGRADECIMIENTOS***



En primer lugar, deseo agradecer a la Dra. Nuria Vilaboa que me permitiera formar parte de su grupo de investigación y que me hiciera un hueco en la poyata para poder llevar a cabo esta tesis. Sé que el que yo haya podido realizarla es el esfuerzo de muchos años y por ello no puedo más que expresarle mi más sincero agradecimiento. Además, deseo agradecerle que a lo largo de todos estos años me haya animado a ir un poco más allá de lo que yo creía que podía, a investigar, a perfeccionar y a ser cuidadosa con el trabajo que realizaba. Gracias a su ayuda y consejos he aprendido mucho más de lo que se puede reflejar en este trabajo. Gracias de corazón.

Querría agradecer al Dr. José Luís González-Carrasco, del Departamento de Metalurgia Física del Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas (CENIM-CSIC, Madrid) por habernos facilitado las aleaciones Ti64 con las que he trabajado durante estos años, y por prestarme su ayuda siempre que lo he requerido. A la Dra. María Luisa González-Martín, del Grupo de Superficies e Interfases del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Extremadura (Unex, Badajoz), por estar siempre dispuesta a realizar los trabajos más *físicos* y explicar las dudas que me han ido surgiendo. Al Dr. Manuel Arruebo, del Grupo de Superficies y Partículas Nanoestructuradas del Instituto de Nanociencia de Aragón (NFP-INA, Zaragoza), por haber llevado a cabo los ensayos de perfilometría y microscopía electrónica de los soportes lisos y porosos. Al Dr. Donato Monopoli, del Departamento de Ingeniería Biomédica del Instituto Tecnológico de Canarias (ITC, Las Palmas), por habernos facilitado las muestras de Ti64 poroso y toda la información que hemos solicitado. A los Drs. Rams y López-Galisteo del Grupo de Nanomecánica y Caracterización Nanométrica de la Universidad Rey Juan Carlos (Nanolabu, Madrid), por su ayuda con los ensayos de perfilometría óptica de las aleaciones Ti64. Al Dr. Enrique Gómez-Barrena por su apoyo científico a lo largo de estos años y por habernos facilitado muchas de las muestras de hueso que han sido utilizadas en este trabajo, en colaboración con el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario La Paz. Asimismo, quiero agradecer al Servicio de Microscopía Electrónica del Museo de Ciencias Naturales de Madrid, por ayudarme a conseguir las mejores fotografías posibles.

Esta tesis jamás se hubiera podido terminar sin el apoyo y la ayuda que mis compañeros me han regalado durante estos años. Laura, gracias, gracias y gracias. Siempre dispuesta a echar una mano, con una gran sonrisa en la cara, transmitiéndome tranquilidad. Sin tu ayuda incondicional no habría podido llegar hasta el final. Quiero agradecer a Pachi la enorme paciencia que ha tenido siempre conmigo. Por ser mi primer mentor allá en los años del pblast, por tus charlas, por tus ideas, por nuestras discusiones y por ser para mí un ejemplo a seguir. Gracias de todo corazón. A Gema, gracias por echarme siempre una mano cuando lo

he necesitado, por las risas en la pecera y fuera de ella y por estar siempre pendiente de que todo estuviera organizado para poder trabajar a gusto. A Fátima, por estar siempre dispuesta a asesorarme y a echarme una mano cuando era necesario. Gracias por estar ahí y no dejar que los transwell y los alvetex pudieran conmigo. A Alba, por enseñarme los secretos del laboratorio. Por supuesto, no puedo olvidarme de las que ya se fueron. Alicia, tú fuiste la que me desvelaste los secretos ocultos de los materiales y me introdujiste en el apasionante mundo del *ñapismo*, ten por seguro que nunca olvidaré aquella época, gracias por haber estado ahí. A Arancha, por ser compañera dentro y fuera de la pecera, siempre sonriendo, pasara lo que pasara. Tenerte a mi lado durante estos años ha sido un lujo. A Virginia, porque siempre has estado dispuesta a ayudarme cuando estaba perdida y me has enseñado el valor de las cosas bien hechas. He aprendido muchísimo de ti, gracias.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todos mis compañeros de la Unidad: Virginia, Shere, Diego, Jaime, Arancha,... Gracias por haber hecho de estos años una aventura tan divertida. Al Dr. Luis Álvarez y a la Dra. Teresa Bellón, por su inestimable ayuda en el día a día. Y a Maite, por estar siempre dispuesta a aclarar mis dudas de microscopía. ¡Gracias a todos!

Además de la gente directamente relacionada con el laboratorio, hay muchas personas que me han acompañado en estos años a las cuales debo mencionar, porque gracias a ellas estoy escribiendo estas palabras. Gracias a Veva, Tomás, Clara y Diego por dejarme formar parte de vuestra vida. Gracias a los *Gallegos por el mundo*, a los *santamarianos* y a mis biólogos coruñeses, no puedo expresar con palabras lo felices que me hacéis. A Ana y a Marina, porque el efecto Sagunto sí ha funcionado, os he encontrado a vosotras. A Cris y a Cova, por estar siempre ahí. A Álvaro y a Diz, por ser parte esencial de mi familia *madrileira*. A Pedro, porque da igual el tiempo que pase y lo lejos que estés, siempre estás conmigo. A Nux, porque no me merezco alguien tan bueno a mi lado. Espero que seas tan feliz como te mereces. A Pablo, por haber sido y ser parte de mi mejor *Madriz*. A Icí y a Pablo, porque siempre estáis a mi lado, apoyándome, haciéndome feliz y queriéndome sin pedir nada a cambio. Sabéis que no podría estar lejos de vosotros. Un GRACIAS con mayúsculas a Ángela y Paula, a mis *conchas*, mis comadres, mis hermanas. Gracias por las risas, por escuchar, por llorar, por bailar y por todo lo que nos queda por vivir. Formáis parte de mi felicidad.

A los Crespo y a los García, a Tere y a Juan, a mis padrinos y a todos aquellos que formáis parte de mi familia, que me habéis visto crecer y que me habéis ayudado a llegar hasta aquí. A Sandra y a Icí, porque sois más que mis primas, gracias por vuestra amistad. A mis abuelos, porque sois una de las mejores cosas que tengo a mi lado y sin vosotros, la vida sería mucho más aburrida.



A mis padres, Paco y Carmen. Gracias por el esfuerzo de toda una vida. Haber crecido a vuestro lado es lo mejor que me ha pasado. Gracias por regalarme alas y enseñarme a volar. Por enseñarme a levantarme cuando me tropiezo y por empujarme a perseguir mis sueños sin importar lo que sucede alrededor. Por la felicidad que siempre reina alrededor de vuestra mesa, por vuestro amor incondicional y por ser como sois. ¡Gracias!

Por último, debo agradecer la ayuda económica prestada durante estos cuatro años al Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2010-034989), sin la cual nunca hubiera podido realizar este trabajo.



***RESUMEN***



La aleación Ti6Al4V se utiliza en la fabricación de implantes osteoarticulares debido a sus excelentes propiedades mecánicas, baja toxicidad y buena resistencia a la corrosión. La resistencia a la corrosión se debe a la formación espontánea de una capa de óxido en su superficie, cuya estabilidad se puede alterar en contacto con el medio fisiológico. Con el fin de mejorar la estabilidad de esta capa superficial, en este trabajo se ha sometido la aleación Ti6Al4V a tratamientos mediante percusión con láser ("Laser Peening", LP) empleando dos densidades de pulsos de láser, 421 pulsos/cm<sup>2</sup> o 2.524 pulsos/cm<sup>2</sup>. La capa superficial de las aleaciones tratadas mediante LP, con rugosidad en el rango submicrométrico, contiene TiO metaestable, además de Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e hidróxido de aluminio en su zona más externa. En función de la densidad de pulsos empleada, el tratamiento genera rutilo en dicha capa superficial. Tanto las células madre mesenquimales como los osteoblastos humanos se adhieren a las aleaciones tratadas de forma similar que a la aleación sin tratar. Sin embargo, el proceso de adhesión no ocurre a través de la formación de adhesiones focales que contienen paxilina o FAK fosforilada en la tirosina 397. Ambos tipos celulares proliferan y forman matriz extracelular sobre las aleaciones tratadas de forma similar que sobre la aleación sin tratar. Las aleaciones tratadas favorecen tanto la maduración osteogénica de células madre mesenquimales como la formación de una matriz mineralizada por parte de osteoblastos.

En este trabajo también se ha evaluado la influencia de biomateriales con diferentes características químicas y topográficas, tales como poliéster liso, poliestireno poroso, aleación de Ti6Al4V lisa o porosa e hidrogeles de fibrina, sobre el comportamiento de células madre mesenquimales humanas. Asimismo, hemos estudiado la influencia de estos biomateriales en la relación paracrina que establecen las células madre mesenquimales con células osteoblásticas, células madre mesenquimales o células endoteliales humanas. Se observó que las características de los materiales juegan un papel relevante en el control que las células madre mesenquimales ejercen sobre la viabilidad y actividad de los osteoblastos, condicionando tanto la producción de proteínas relacionadas con la organización de la matriz ósea por parte de éstos como la producción de factores implicados en el proceso de remodelado óseo. Además, también regulan el control que las células madre mesenquimales ejercen sobre la supervivencia, capacidad de migración y formación de estructuras tubulares de células endoteliales. Observamos asimismo que el sustrato sobre el que se cultivan las células madre modula las relaciones que establecen con poblaciones del mismo tipo celular con las que no establecen contacto directo, influyendo en su viabilidad. Finalmente, el estudio reveló que las características de los materiales en los que se siembran las células madre mesenquimales modula su respuesta a factores solubles secretados por osteoblastos, células madre mesenquimales y células endoteliales.



## ***SUMMARY***





Ti6Al4V alloy is the most widely used metallic biomaterial for the fabrication of orthopaedic implants due to its mechanical strength, good corrosion resistant and low toxicity. Its corrosion resistance is due to the oxide film, which forms spontaneously on exposure to air. The interaction with physiological fluids results in alteration of the stability of the passive layer, accounting for increased metal ion release. To improve the stability of the outer layer, Ti6Al4V alloy samples were subjected to Laser Peening (LP) treatment, using two different laser pulse densities, 421 pulses/cm<sup>2</sup> or 2524 pulses/cm<sup>2</sup>. The superficial layer of treated samples, which exhibited roughness at the submicron-scale, contains metastable TiO, Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and aluminum hydroxide. Depending on the laser pulse densities used, the surface of the treated Ti6Al4V alloy also contains rutile. Human mesenchymal stem cells and osteoblasts attach to same extent to treated and non-treated alloys. However, adhesion to LP-treated surfaces does not proceed through the formation of focal adhesions containing paxillin or FAK phosphorylated in tyrosine 397. Human mesenchymal stem cells and osteoblasts similarly proliferate and organize an extracellular matrix in treated and non-treated Ti6Al4V alloys. Compared to untreated alloy, osteogenic maturation of mesenchymal stem cells and osteoblasts matrix mineralization was enhanced in LP-treated alloys.

We have also studied the influence of topographical and chemical characteristics of several biomaterials, namely smooth polyester, porous polystyrene, smooth and porous Ti6Al4V alloy and fibrin hydrogel, in human mesenchymal stem cells behavior. In addition, the influence of these biomaterials in the paracrine cross-talks that establish, in the absence of direct contact, human mesenchymal stem cells and human osteoblasts, mesenchymal stem cells or endothelial cells was evaluated. The topographical and chemical characteristics of the materials influence the control that human mesenchymal stem cells exert on osteoblast viability and activity, tuning the production of proteins associated with ECM organization and factors related with bone remodeling. Also, the remote control of mesenchymal stem cells on endothelial cell survival, migration and formation of tubule-like structures as well as on the viability of mesenchymal stem cells is influenced by biomaterials characteristics. Finally, the study revealed that the topographical and chemical characteristics of biomaterials where human mesenchymal stem cells are seeded modulate their response to paracrine factors secreted by human osteoblasts, other mesenchymal stem cells and endothelial cells.



## ***ÍNDICE***



<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
1. ESTRUCTURA DEL TEJIDO ÓSEO .....	7
1.1. Matriz y células óseas .....	7
1.2. Remodelado óseo .....	9
1.3. El sistema vascular en el tejido óseo .....	10
1.4. Reparación y regeneración de lesiones óseas .....	10
2. MATERIALES PARA REGENERACIÓN Y REPARACIÓN ÓSEA .....	14
2.1. Materiales para regeneración ósea .....	14
2.1.1. Polímeros .....	14
2.1.1.1. Hidrogeles de fibrina .....	15
2.1.2. Cerámicas .....	16
2.1.3. Materiales compuestos .....	16
2.2. Materiales para reparación osteoarticular .....	16
2.2.1. Aleaciones metálicas .....	16
2.2.1.1. Aleaciones de acero inoxidable .....	16
2.2.1.2. Aleaciones de base de cobalto .....	17
2.2.1.3. Aleaciones de titanio .....	17
2.2.2. Modificaciones superficiales de la aleación Ti64 .....	18
2.2.2.1. Modificaciones mecánicas .....	18
2.2.2.2. Modificaciones químicas .....	18
2.3. Aleación Ti64 porosa para regeneración y reparación ósea .....	19

3. ADHESIÓN Y RESPUESTA CELULAR FRENTE A LAS PROPIEDADES SUPERFICIALES DE LOS MATERIALES .....	20
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
1. MATERIALES ENSAYADOS .....	29
1.1. Caracterización de los materiales ensayados .....	30
2. CULTIVOS CELULARES .....	32
2.1. Cultivos celulares en los materiales .....	33
2.2. Cocultivos .....	33
2.3. Viabilidad celular .....	35
2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	35
2.5. Ensayos de inmunofluorescencia .....	35
2.6. Ensayos de adhesión celular .....	36
2.7. Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina (FA) .....	36
2.8. Cuantificación de la formación de nódulos minerales .....	37
2.9. Detección de la secreción de FN, COLI, OPG, RANKLs, M-CSF, TGF- $\beta$ 1, VEGF, Flt-1 y p-FAK Y397 .....	37
2.10. Cuantificación de la expresión de <i>ALPL</i> , <i>COL1A1</i> y <i>BGLAP</i> .....	38
2.11. Ensayo de migración celular .....	39
2.12. Ensayos de formación de estructuras tubulares .....	39
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	41

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
1. COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS SOBRE LA ALEACIÓN Ti64 MODIFICADA MEDIANTE LP .....	45
1.1. Caracterización superficial de los materiales .....	45
1.2. Morfología, adhesión y área celular sobre Ti64 modificada mediante LP .....	48
1.3. Viabilidad celular y formación de matriz extracelular sobre Ti64 modificada mediante LP .....	56
1.4. Actividad FA y grado de mineralización sobre Ti64 modificada mediante LP .....	58
2. CARACTERIZACIÓN DE SOPORTES LISOS Y POROSOS .....	59
3. VIABILIDAD, MORFOLOGÍA CELULAR Y PRODUCCIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES CULTIVADAS SOBRE SOPORTES LISOS Y POROSOS .....	60
4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE hMSC <sup>S</sup> CULTIVADAS EN SOPORTES POROSOS SOBRE OSTEÓBLASTOS .....	61
4.1. Efecto sobre la viabilidad celular .....	61
4.2. Efecto sobre la secreción de FN .....	61
4.3. Efecto sobre marcadores de fenotipo osteoblástico: COLI, FA, osteocalcina y grado de mineralización .....	63
4.4. Efecto sobre la secreción de OPG y RANKLs .....	67
4.5. Efecto sobre la secreción de M-CSF .....	72
4.6. Efecto sobre los niveles de TGF- $\beta$ 1 en la capa celular .....	73
5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE hMSC <sup>S</sup> CULTIVADAS EN SOPORTES POROSOS SOBRE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES .....	75
5.1. Efecto sobre la viabilidad celular .....	75

5.2. Efecto sobre la actividad FA de hMSC .....	76
5.3. Efecto sobre la migración de hMSC .....	77
6. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE hMSC <sup>S</sup> CULTIVADAS EN SOPORTES POROSOS SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES .....	77
6.1. Efecto sobre la viabilidad celular .....	78
6.2. Efecto sobre la actividad FA .....	79
6.3. Efecto sobre la migración celular y la formación de estructuras tubulares .....	79
6.4. Efecto sobre la secreción de VEGF y su receptor Flt-1 .....	81
7. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE hMSC <sup>S</sup> CULTIVADAS EN HIDROGELES DE FIBRINA SOBRE OSTEOLASTOS, CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y CÉLULAS ENDOTELIALES .....	83
7.1. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC <sup>S</sup> sembradas en hidrogeles de fibrina y hOB .....	84
7.2. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC <sup>S</sup> sembradas en hidrogeles de fibrina y hMSC .....	85
7.3. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC <sup>S</sup> sembradas en hidrogeles de fibrina y HUVEC .....	86
7.4. Efecto de hMSC <sup>S</sup> sembradas en hidrogeles de fibrina sobre la migración de hMSC y HUVEC .....	87
8. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE hMSC <sup>S</sup> CULTIVADAS EN Ti64 POROSO SOBRE OSTEOLASTOS, CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y CÉLULAS ENDOTELIALES .....	88
8.1. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC <sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso y hOB .....	88
8.2. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC <sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso y hMSC .....	89
8.3. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC <sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso y HUVEC .....	90



8.4. Efecto de hMSC <sup>s</sup> sembradas en Ti64 poroso sobre la migración celular de hMSC y HUVEC .....	90
8.5. Efecto de hMSC <sup>s</sup> cultivadas en Ti64 poroso o liso sobre el comportamiento de hOB .....	91
8.5.1. Efecto sobre la viabilidad celular .....	91
8.5.2. Efecto sobre la actividad FA .....	92
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>95</b>
1. COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS SOBRE LA ALEACIÓN Ti64 MODIFICADA MEDIANTE LP .....	97
2. EFECTO DE LA POROSIDAD DEL MATERIAL EN EL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES .....	101
3. EFECTO DE LA POROSIDAD DEL MATERIAL EN EL QUE SE CULTIVAN LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE LAS RELACIONES PARACRINAS QUE ESTABLECEN CON OSTEÓBLASTOS .....	103
4. EFECTO DE LA POROSIDAD DEL MATERIAL EN EL QUE SE CULTIVAN LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE LAS RELACIONES PARACRINAS QUE ESTABLECEN CON OTRAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES .....	106
5. EFECTO DE LA POROSIDAD DEL MATERIAL EN EL QUE SE CULTIVAN LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE LAS RELACIONES PARACRINAS QUE ESTABLECEN CON CÉLULAS ENDOTELIALES .....	108
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>113</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>117</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>135</b>



## ***ABREVIATURAS***



AFM: Microscopía de fuerza atómica  
ALPL: gen que codifica fosfatasa alcalina  
ARNm: ácido ribonucleico mensajero  
BGLAP: gen que codifica osteocalcina  
BMP: proteína morfogenética del hueso  
CD34: antígeno de célula progenitora hematopoiética  
COLI: procolágeno tipo 1  
COL1A1: gen que codifica colágeno tipo I  
DRX: difracción de rayos X  
ECM: matriz extracelular  
EGF: factor de crecimiento epidérmico  
FA: fosfatasa alcalina  
FAK: quinasa de adhesión focal  
p-FAK Y397: quinasa de adhesión focal fosforilada en la tirosina 397  
p-FAK Y407: quinasa de adhesión focal fosforilada en la tirosina 407  
FGF: factor de crecimiento fibroblástico  
Flt-1: quinasa de tirosina relacionada con fms 1, receptor 1 de VEGF  
FN: fibronectina  
GTPasa: guanosina tirofosfatasa  
HUVEC: células endoteliales humanas de vena del cordón umbilical  
IGF: factor de crecimiento insulínico  
ILK: quinasa ligada a integrina  
KDR: receptor del inserto del dominio quinasa, receptor 2 de VEGF.  
LP: “laser peening”  
LP1: tratamiento “laser peening” con una densidad de pulsos de 421 pulsos/cm<sup>2</sup>  
LP2: tratamiento “laser peening” con una densidad de pulsos de 2.524 pulsos/cm<sup>2</sup>  
MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1  
M-CSF: factor macrofágico estimulador de colonias  
(h)MSC: células madre mesenquimales (humanas)  
hMSC<sup>S</sup>: células madre mesenquimales humanas sembradas en soportes  
(h) OB: osteoblastos (humanos)  
OPG: osteoprotegerina  
PECAM-1: molécula de adhesión a plaquetas de las células endoteliales  
Pyk2: quinasa rica en prolina 2  
RANKL(s): ligando del receptor nuclear KB (soluble)

Rrms: media cuadrática de la rugosidad

SEM: microscopía electrónica de barrido

TCP- $\beta$ : fosfato tricálcico  $\beta$

TGF- $\beta$ 1: factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1

Ti64: aleación de titanio (90 %), aluminio (6 %) y vanadio (4 %)

Ti6Al4V: aleación de titanio (90 %), aluminio (6 %) y vanadio (4 %)

Tof-Sims: espectrometría de masas de iones secundarios por tiempo de vuelo

TRAP: fosfatasa ácida resistente a tartrato

VE-cadherinas: caderinas vasculoendoteliales

VEGF: factor de crecimiento vasculoendotelial

XPS: espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

## ***INTRODUCCIÓN***





## **1. ESTRUCTURA DEL TEJIDO ÓSEO**

El hueso es un tejido conectivo con importantes funciones en el mantenimiento del organismo: ejerce de soporte estructural, protege a los órganos vitales, posibilita la locomoción del individuo y es reservorio de numerosos minerales necesarios para el mantenimiento de la homeostasis (Sikavitsas, 2001). Aunque los huesos del esqueleto presentan formas y tamaños diferentes, en todos ellos se puede distinguir una estructura común: una zona exterior de hueso cortical más dura y más internamente, una zona de hueso trabecular. Los huesos se pueden clasificar atendiendo a su forma como huesos largos, cortos, planos, irregulares o sesamoideos; o a su desarrollo mediante osificación endocondral o intramembranosa. El hueso cortical o compacto posee una estructura densa y ordenada con un 10 % de porosidad. Está constituido por unidades estructurales denominadas osteonas, compuestas por laminillas concéntricas de matriz ósea dispuestas alrededor de un conducto central, el sistema de Havers, que alberga los vasos sanguíneos y linfáticos. El hueso trabecular presenta entre un 50 y un 90 % de porosidad, lo que le otorga un aspecto esponjoso. Está compuesto por un conjunto de ramificaciones óseas dispuestas en diferentes direcciones que se denominan trabéculas y que forman una red irregular en el interior de la cual se halla la médula ósea (Datta, 2008). Independientemente de su estructura, forma u origen, el hueso está compuesto por dos componentes principales: (1) una matriz ósea formada tanto por proteínas como por minerales y (2) células especializadas en la formación y mantenimiento de la integridad ósea.

### **1.1. Matriz y células óseas**

La parte inorgánica de la matriz ósea está formada principalmente por un fosfato cálcico con estructura similar a la hidroxiapatita. Además, también contiene magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor en bajas proporciones. La parte orgánica de la matriz del hueso está compuesta por un 90 % de proteínas de colágeno, principalmente colágeno tipo I, y un 10 % de otras proteínas como osteocalcina, osteopontina o fibronectina (FN).

En el tejido óseo existen diferentes tipos celulares como osteoblastos, células madre mesenquimales (MSC), osteocitos y osteoclastos, entre otros. A los osteoblastos se les denomina células formadoras de hueso, ya que una de sus principales funciones es depositar los componentes proteicos de la matriz orgánica y posibilitar la mineralización del tejido (Capulli, 2014). También participan en el mantenimiento de la masa ósea y desarrollan funciones endocrinas relacionadas con la secreción de la hormona paratiroidea (Guntur, 2012). Los osteoblastos se originan a partir de MSC, células madre adultas multipotentes, adherentes y con capacidad de diferenciación a distintas estirpes celulares como osteoblastos, condrocitos, mioblastos o adipocitos. Las MSC son abundantes en la médula ósea y en el tejido

adiposo, pero también se localizan en otros tejidos como pulmones, placenta o gelatina de Wharton (Sohni, 2013). El proceso de diferenciación a osteoblastos, denominado osteogénesis, está regulado por numerosas vías de señalización que se activan secuencialmente. Durante este proceso, las células maduran a través de diferentes estados funcionales: preosteoblastos, osteoblastos, osteocitos y células de revestimiento o quiescentes. Los preosteoblastos son morfológicamente similares a los osteoblastos y promueven la mineralización de la matriz celular mediante la secreción de la enzima fosfatasa alcalina (FA) (Aubin, 1998). Los osteoblastos maduros secretan los componentes de la matriz de osteoide y posibilitan su mineralización y, por tanto, se localizan en lugares donde se está formando hueso activamente. Una vez completan la deposición de las proteínas que constituyen la matriz ósea, los osteoblastos mueren a través de un proceso apoptótico o bien se transforman en células de revestimiento que tapizan la superficie del hueso (Kular, 2012). Una cierta proporción de osteoblastos quedará embebida en la matriz mineralizada dando lugar a osteocitos, que presentan forma estrellada debido a las largas prolongaciones citoplasmáticas tipo dendritas que los conectan a través de la matriz con otros osteocitos y con células de la superficie como osteoblastos, osteoclastos y células de revestimiento. Gracias a esta red de interconexiones, los osteocitos detectan microfracturas o cambios en las cargas que soporta el hueso y transforman estas señales mecánicas en señales químicas, que transmitirán a otras células con el fin de controlar la homeostasis del tejido (Bonewald, 2011; Burra, 2010).

Los osteoclastos, implicados en el mantenimiento de la masa ósea junto con los osteoblastos, son células multinucleadas que resorben el hueso y que derivan de precursores monocito/macrófago a través de un proceso denominado osteoclastogénesis, controlado por la actividad de MSC y osteoblastos. La diferenciación hacia el linaje osteoclástico se regula mediante citoquinas como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) o el sistema RANKL/OPG (ligando del receptor nuclear KB/osteoprotegerina), proteínas secretadas por MSC y osteoblastos (Yamashita, 2012). Las células precursoras expresan en su superficie los receptores RANK y c-Fms, que al unirse a sus respectivos ligandos, RANKL y M-CSF, inician una cascada de señalización que activará genes implicados en la maduración de los osteoclastos, como la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) o c-Fos. Además, se producen cambios estructurales en las células como la reorganización de su citoesqueleto y el anclaje de los osteoclastos, mediante uniones mediadas por integrinas, a la superficie del hueso que se va a remodelar (Boyle, 2003). Los osteoblastos modulan este proceso a través de la secreción de OPG, un receptor soluble que se une a RANKL impidiendo su unión al receptor RANK y, por tanto, inhibiendo la osteoclastogénesis.

## 1.2. Remodelado óseo

El constante recambio de la masa ósea mediante el proceso de remodelado implica que de forma continua zonas del hueso se destruyen por los osteoclastos, siendo sustituidas a continuación por hueso nuevo que forman los osteoblastos (Riancho, 2003). Este proceso contribuye a (1) renovar aquellas partes del esqueleto que hayan podido acumular fracturas o lesiones por fatiga, (2) efectuar pequeñas modificaciones estructurales que permitan adaptar el hueso a los estímulos mecánicos recibidos y (3) mantener un reservorio de calcio y fósforo. El remodelado óseo es un proceso muy controlado, ya que el desequilibrio entre la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos conduce al desarrollo de enfermedades como osteoporosis u osteopetrosis (Kular, 2012). El proceso se inicia con la liberación de factores locales en respuesta a microfracturas, cambios en las cargas del hueso o en la homeostasis del calcio (Raggatt, 2010). En general, estas señales inician una fase de activación en la que se produce un aumento en la generación de osteoclastos, bien sea por una mayor atracción de precursores a la zona o por un aumento en la tasa de maduración de precursores locales. Por ejemplo, los osteocitos secretan un factor inhibidor de la osteoclastogénesis, el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ). Al producirse pequeñas fracturas en la matriz ósea, los osteocitos sufren procesos apoptóticos que conducen a una disminución local en la liberación del TGF- $\beta 1$ , y por tanto a la disminución de su actividad represora, lo que aumenta la tasa de maduración de precursores osteoclastóticos (Heino, 2002). También la hormona paratiroidea, secretada por las glándulas paratiroideas en respuesta a bajos niveles de calcio circulantes, activa la liberación de factores en el hueso que reclutan precursores osteoclastóticos, como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) o factores que modulan el proceso de osteoclastogénesis, como RANKL o M-CSF (Raggatt, 2010). En respuesta a las diferentes señales, los precursores se diferencian a osteoclastos maduros con capacidad para destruir la matriz ósea. En una primera etapa de la fase de resorción, los osteoclastos acidifican y disuelven la parte inorgánica de la matriz y, posteriormente, liberan enzimas lisosomales, como la catepsina K, que digirán la parte orgánica. La destrucción de la matriz da lugar a la liberación de factores solubles embebidos en ella, como las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), el factor de crecimiento insulínico (IGF) o TGF- $\beta 1$ , que actúan promoviendo la migración de MSC a la zona durante la fase de inversión. Estos precursores se diferenciarán a osteoblastos que sintetizarán y depositarán la matriz osteoide (Kular, 2012). En esta fase de formación ósea, se secretan proteínas que formarán parte de la matriz ósea como osteopontina, FN o colágeno tipo I. Este último se secreta en forma del precursor procolágeno tipo I (COLI), que contiene dos propéptidos en sus extremos. Estos propéptidos se liberarán mediante la acción de proteasas específicas, posibilitando la formación de las fibras de

colágeno tipo I. En una fase posterior de la formación de la matriz ósea, los osteoblastos inician la formación de cristales de fosfato cálcico. Estos cristales se forman en vesículas celulares que internalizan iones de calcio y fosfatos, donde precipitan como fosfatos de calcio en forma de cristales tipo hidroxiapatita. Se liberan al exterior celular y continúan creciendo mediante la adición de iones calcio y fosfatos. La osteocalcina, una proteína secretada exclusivamente por los osteoblastos durante sus últimas fases de maduración juega un papel positivo en la nucleación de los cristales tipo hidroxiapatita, a los que se une con alta afinidad (Boskey, 1998). En el ambiente extracelular también existen inhibidores del crecimiento de la hidroxiapatita como los pirofosfatos inorgánicos que compiten con los fosfatos para formar los cristales (Addison, 2007). La FA, secretada por los osteoblastos, promueve la mineralización mediante la formación de fosfatos a partir de pirofosfatos (Sikavitsas, 2001; Orimo, 2010).

### **1.3. El sistema vascular en el tejido óseo**

Un requerimiento fundamental en la formación de tejido óseo es el desarrollo de un sistema vascular adecuado. La formación de nuevos vasos sanguíneos es esencial tanto en el desarrollo de los huesos durante el periodo embrionario y de crecimiento como en el proceso de remodelado. Los huesos largos están irrigados por grandes arterias que penetran en ellos a través de forámenes y se van dividiendo hasta formar vasos más pequeños que irrigan toda la matriz ósea. Los vasos sanguíneos están formados por diferentes capas: una capa interna de células endoteliales, una túnica media de células musculares lisas y una túnica adventicia más externa formada por fibras de colágeno y fibras elásticas. Cuando el tejido óseo sufre falta de oxígeno, MSC y osteoblastos secretan señales moleculares indicadoras de hipoxia, como el factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF). Éste se une a sus receptores, Flt-1 y KDR, en las células endoteliales de los vasos sanguíneos próximos, lo que conduce a un aumento de su permeabilidad y a la liberación de proteasas que facilitan el remodelado de la matriz extracelular (ECM) y la formación de una nueva pseudomatriz que servirá de soporte para la formación de un nuevo vaso. El VEGF y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), liberados de la ECM durante su remodelado, posibilitan que las células endoteliales migren a través de la pseudomatriz, se dividan y elonguen para generar el nuevo vaso. Además, la expresión de proteínas de unión célula-célula como las cadherinas o CD34 posibilita la formación del lumen del vaso (Carmeliet, 2011).

### **1.4. Reparación y regeneración de lesiones óseas**

De forma fisiológica, el tejido óseo es capaz de reparar lesiones y defectos de su estructura mediante un proceso muy similar al de remodelado. Al contrario de lo que sucede en los

tejidos blandos, esta reparación ocurre sin la formación de una cicatriz fibrótica, que comprometería las propiedades mecánicas del hueso (Saran, 2014). Tras una fractura, la ruptura de los vasos sanguíneos provoca hipoxia local, una señal clave para que los osteoblastos localizados en la zona secreten VEGF. Este factor promueve la migración de las células endoteliales a la zona, donde proliferan y restablecen el sistema vascular. Además, las células endoteliales secretan citoquinas como BMP-2 que favorecen la migración de precursores osteoblásticos desde tejidos adyacentes (Carmeliet, 2011; Wang, 2011). Las MSC atraviesan la barrera endotelial antes de llegar a la zona de remodelado, mediante un mecanismo similar al de la migración transendotelial de los leucocitos (Teo, 2012; Yellowley, 2013). Una vez en la zona fracturada y dependiendo de si la fractura es mecánicamente estable o no, las MSC inician un proceso de osteogénesis o condrogénesis, respectivamente (Sikavitsas, 2001). El proceso de condrogénesis implica la formación de un tejido cartilaginoso denominado *callo blando* cuya función es aportar cierta estabilidad mecánica y servir de molde para la posterior generación del tejido óseo. Tras la formación del *callo blando*, los condrocitos experimentan hipertrofia y promueven la mineralización de la zona antes de entrar en apoptosis, liberando factores de crecimiento que estimulan la diferenciación osteoblástica, iniciándose un periodo de alta actividad en el que se mineraliza la matriz, formándose el *callo duro* (Cameron, 2013; Schindeler, 2008). Sin embargo, este tejido mineralizado posee una matriz desorganizada y mecánicamente débil, por lo que debe ser rápidamente reemplazado por una matriz más organizada, mediante el proceso de remodelado óseo llevado a cabo por osteoclastos y osteoblastos.

Existen determinadas lesiones óseas que no se reparan espontáneamente y requieren intervención externa, como son los denominados defectos de tamaño crítico, causados por traumatismos de gran magnitud, infecciones, tumores o cirugías. Además, existen factores de riesgo como la edad avanzada y la obesidad, y patologías como la artritis reumatoide o la osteoporosis, que comprometen la regeneración de las lesiones óseas (Amini, 2012; Cameron, 2013; Walsh, 2006). Las estrategias terapéuticas actuales contemplan los trasplantes autogénicos o alógenicos de hueso, ya que integran todos los elementos necesarios para la regeneración ósea: células osteoprogenitoras como componente osteogénico, factores de crecimiento embebidos en la matriz como componentes osteoinductivos y un soporte tridimensional sobre el que generar el nuevo tejido como componente osteoconductor (Berner, 2012). En el caso de los injertos autogénicos existe limitación en la cantidad de tejido susceptible de ser trasplantado y puede generar morbilidad en el lugar de donde se obtiene. Además, pueden existir incompatibilidades entre los tamaños y formas del hueso donante y receptor (Burg, 2000). En cuanto a los injertos alogénicos, no se puede descartar un cierto

riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas. La ingeniería tisular ósea es una de las disciplinas en las que se está investigando más activamente sobre cómo soslayar estos problemas. Explora el uso de varios componentes: células osteoprogenitoras como componente osteogénico; factores de crecimiento que promuevan la osteogénesis como componente osteoinductivo; un componente osteoconductor o soporte que sirva de anclaje a las células y proporcione la estabilidad mecánica que permitirá al tejido organizarse espacialmente; e investiga métodos que aseguren la formación de un sistema vascular apropiado que nutra y oxigene al hueso (Amini, 2012; Koh, 2004).

La ingeniería de tejidos ha explorado soportes acelulares así como en combinación con células. En los primeros, el componente osteogénico lo proporciona el tejido en donde se implanta el material, siendo las células circundantes las que colonizan el interior del soporte. Sin embargo, en soportes de grandes dimensiones, esta colonización suele ser minoritaria, lo que origina el fracaso del implante debido a una deficiente transmisión de cargas en la zona interna, donde no se regenera el tejido óseo. En el caso de la ingeniería tisular con componente celular, las células osteoprogenitoras, idealmente extraídas del propio paciente, se expanden en el laboratorio y se siembran *ex vivo* en los soportes, generando un intermediario tisular que será posteriormente implantado. Una de las limitaciones más importantes de este proceso es la dificultad para obtener un número lo suficientemente grande de células del paciente (Koh, 2004). Las MSC poseen características que las hacen especialmente atractivas para su uso en ingeniería tisular ya que poseen una capacidad proliferativa que permite su expansión en el laboratorio y pueden extraerse de numerosos tejidos, incluyendo la médula ósea o el tejido adiposo (Berner, 2012). La incorporación *ex vivo* de MSC en materiales para ingeniería tisular es una estrategia que pretende acelerar tanto la osteogénesis como la integración del implante. Múltiples estudios han demostrado la efectividad de sembrar MSC en los materiales previamente a su integración en el hueso. Por ejemplo, un experimento llevado a cabo en defectos generados en fémur de rata demostró que la implantación de soportes porosos de hidroxiapatita y fosfato tricálcico  $\beta$  en los que se habían sembrado MSC promovía una rápida regeneración y vascularización del defecto, mientras que en los animales que recibieron el material libre de células se detectó formación de tejido fibroso pero no óseo (Bruder, 1998).

El potencial terapéutico de las MSC no está únicamente relacionado con su propia capacidad osteogénica, sino que es muy importante el control paracrino que ejercen sobre la diferenciación, migración y actividad de otras células osteoprogenitoras u otros tipos celulares. En este sentido, se ha observado que el cocultivo de MSC con osteoblastos o con células endoteliales modula la expresión de marcadores de maduración osteogénica y de genes

angiogénicos, respectivamente (Laranjeira, 2012; Sun, 2012). Además, diversos estudios *in vitro* indican que las células madre mesenquimales responden a estímulos liberados por otras células madre mesenquimales, migrando hacia medios condicionados de cultivos de células osteoprogenitoras (Menon, 2007). Por otro lado, las MSC tienen propiedades inmunomoduladoras, lo que las convierte en herramientas muy interesantes en ingeniería tisular, ya que la implantación del soporte puede generar una reacción inflamatoria que comprometa la reparación y regeneración del hueso (Anderson, 2008; Bryers, 2012). Experimentos de cocultivo indican que las MSC inducen en los macrófagos un fenotipo regulador caracterizado por la baja liberación de citoquinas proinflamatorias (Maggini, 2010). Pese a las múltiples evidencias que indican que las MSC controlan la actividad de otros tipos celulares, existe muy poca información sobre el papel que juegan las características de los soportes para ingeniería tisular sobre los que se cultivan las MSC en la modulación de la secreción de factores paracrinós.

El envejecimiento progresivo de la población ha conducido a un importante aumento en la incidencia de patologías osteoarticulares de tipo degenerativo. Asimismo se ha producido un incremento en el número de personas jóvenes con trastornos en el aparato locomotor, como consecuencia de accidentes de circulación o la práctica de deportes de alto riesgo. En muchas ocasiones, el tratamiento médico conservador no logra resolver estas lesiones por lo que es necesario el reemplazo de la articulación por elementos artificiales conocidos como implantes ortopédicos o prótesis. Las articulaciones que más se intervienen son la de rodilla y cadera. Esta última consta de diferentes partes: un vástago metálico o componente femoral que se introduce en el interior del canal medular del fémur; una cabeza esférica metálica o cerámica, que se acopla al vástago; y un componente acetabular metálico o cerámico con una superficie articulante generalmente de polietileno, que sustituye la parte de la articulación de la cadera unida a la pelvis. En el caso de la sustitución de la rodilla, el extremo inferior del fémur se sustituye por un componente metálico que se curva alrededor del extremo del fémur, posibilitando el movimiento de la articulación, y el extremo superior de la tibia se sustituye por una componente de plástico. La cirugía de sustitución articular no es una intervención definitiva y en muchos casos se requiere una segunda intervención para reemplazar la prótesis. De hecho, aproximadamente un 10 % de las sustituciones articulares requieren una cirugía de revisión en los 10 primeros años. Entre las causas que conducen al fallo de la prótesis destacan una mala osteointegración del implante o el aflojamiento aséptico de la prótesis producida por generación de productos de degradación del implante (Goodman, 2009). Éstos pueden ser partículas de desgaste liberadas por el material debido a micromovimientos entre la prótesis y la superficie ósea o a procesos de fricción entre

diferentes partes de la prótesis; partículas e iones liberados por la corrosión que sufren los componentes metálicos debido a su interacción con el agresivo medio fisiológico; o partículas liberadas por microrroturas que sufre el material debido a las cargas a las que está sometido.

## **2. MATERIALES PARA REGENERACIÓN Y REPARACIÓN ÓSEA**

### **2.1. Materiales para regeneración ósea**

Los materiales para ingeniería tisular ósea deben presentar propiedades que permitan la generación de un tejido con propiedades funcionales y estructurales similares a las del hueso (Stevens, 2008). El hueso presenta una organización jerárquica con dimensiones en el rango macrométrico como las estructuras trabeculares, micrométrico como las osteonas y nanométrico como las proteínas o cristales minerales que constituyen la matriz ósea. Por ello la estructura de los materiales empleados en ingeniería tisular ósea debería mimetizar esta organización con el fin de facilitar la adhesión, proliferación y actividad de las células implicadas en el proceso de regeneración del hueso. Así, los soportes han de presentar una estructura porosa interconectada que varíe desde la macro a la microporosidad y que permita la migración y penetración de las células osteoformadoras y del sistema circulatorio (Mallick, 2013; Rezwan, 2006). Por otro lado, los soportes para regeneración ósea deben poseer unas buenas propiedades mecánicas que proporcionen al tejido la integridad necesaria hasta que la función biomecánica se haya restablecido. Otra característica deseable es que los materiales sean biodegradables de forma que el soporte sea reemplazado progresivamente por el nuevo tejido óseo. Hasta la fecha, ningún material satisface plenamente estos requisitos, por lo que existe una necesidad creciente de desarrollar nuevos sistemas. Los materiales más frecuentemente explorados son los de naturaleza polimérica, cerámica o combinaciones de ambos. Asimismo, se están investigando materiales basados en metales.

#### **2.1.1. Polímeros**

Los polímeros pueden dividirse en naturales como el alginato, quitosano, colágeno, seda o fibrina y sintéticos como ácidos polilácticos, poliglicólicos, policaprolactona, polihidroxibutirato, hidroxísteres o polianhídridos. Los polímeros naturales presentan buena biocompatibilidad y baja capacidad inmunogénica pero sus principales limitaciones incluyen que su composición puede variar entre lotes y puede existir contaminación o transmisión de virus o enfermedades, además de sus bajas capacidades mecánicas (Mallick, 2013). Sin embargo, los polímeros sintéticos se producen bajo condiciones muy controladas y, por lo



tanto, son muy reproducibles, siendo posible optimizar sus propiedades físicas y mecánicas. En general, las propiedades mecánicas de los polímeros son deficientes y los productos de degradación que liberan pueden desencadenar reacciones inflamatorias (Pilia, 2013).

#### **2.1.1.1. Hidrogeles de fibrina**

La fibrina es un polímero natural biodegradable que en regeneración tisular se usa generalmente en combinación con células. Polimeriza a partir de dos componentes principales: el fibrinógeno y la trombina (Janmey, 2009). El fibrinógeno es una glicoproteína heterodimérica compuesta por tres pares de cadenas polipeptídicas iguales, unidas entre sí. Su polimerización se inicia gracias a la acción de la trombina, una enzima proteolítica que rompe las uniones entre los péptidos del fibrinógeno para producir monómeros de fibrina. Éstos se unen a través de sus extremos para dar lugar a largos polímeros que precipitan, formándose un coágulo o gel. La fibrina, al igual que otros polímeros naturales, genera estructuras tridimensionales altamente hidratadas llamadas hidrogeles. Se trata de materiales muy porosos con una estructura tridimensional similar a la ECM (Gasperini, 2014).

La fibrina interacciona específicamente con numerosos tipos celulares, factores de crecimiento u otros componentes de la ECM como la fibronectina o el ácido hialurónico. Es por ello que los hidrogeles se emplean para encapsular *in vitro* células o factores de crecimiento que se implantarán para promover regeneración tisular (Gasperini; 2014; Janmey, 2009). Por ejemplo, la encapsulación de células madre mesenquimales o células madre embrionarias en hidrogeles de fibrina promueve su diferenciación osteogénica o neural, respectivamente (Janmey, 2009). Además, la implantación de MSC encapsuladas en un hidrogel de fibrina conteniendo nanopartículas cargadas con el factor de crecimiento osteogénico BMP-2 promueve la formación ectópica de tejido óseo en conejos (Park, 2009).

La tasa de degradación y el grado de porosidad de los hidrogeles pueden controlarse en el proceso de polimerización mediante ajustes en la concentración de trombina o fibrinógeno o modificando el pH del medio (Janmey, 2009). La fibrina se degrada por la acción de la plasmina, pudiéndose controlar este proceso mediante el uso de inhibidores de su actividad enzimática (Shaikh, 2008). El control del grado de porosidad pretende modular la proliferación y maduración celular. Por ejemplo, se ha visto que concentraciones bajas de fibrinógeno generan estructuras laxas del hidrogel que favorecen la proliferación de MSC, mientras que concentraciones mayores de fibrinógeno, que resulten en una estructura más densa, inducen la diferenciación osteogénica (Catelas, 2006).

### **2.1.2. Cerámicas**

En este grupo encontramos materiales basados en fosfatos de calcio como la hidroxiapatita o el fosfato tricálcico  $\beta$  (TCP- $\beta$ ). Desde un punto de vista químico y cristalográfico son muy similares a los minerales que se encuentran en la matriz ósea. Se caracterizan por su alta biocompatibilidad y osteoconductividad, por lo que son muy atractivos en ingeniería tisular. Su principal limitación procede de sus pobres propiedades mecánicas, en particular de su alta fragilidad (Katti, 2004). Además, su porosidad no es fácilmente controlable (Pilia, 2013).

### **2.1.3. Materiales compuestos**

Existe un creciente interés en el desarrollo de materiales compuestos por mezclas de polímeros (naturales o sintéticos) y cerámicas. Estos materiales aúnan la osteoconductividad de las cerámicas con la elasticidad de los polímeros. Consisten en matrices de polímeros que se combinan con cerámicas a través de diferentes técnicas como liofilización, “electrospinning” o modelado por deposición fundida, precipitación *in situ*, sinterizado selectivo por láser o impresión 3D, entre otros (Pilia, 2013).

## **2.2. Materiales para reparación osteoarticular**

Las prótesis e implantes osteoarticulares están compuestas por materiales que deben presentar buena biocompatibilidad, con el fin de que sean tolerados por los tejidos en que se implantan sin provocar reacciones tóxicas o adversas, y buena biofuncionalidad, es decir que sus propiedades mecánicas les permitan aportar las mismas prestaciones funcionales que el tejido óseo al que sustituyen.

### **2.2.1. Aleaciones metálicas**

Las aleaciones metálicas no tienen sustitutivos equiparables en implantes que soportan cargas, como las prótesis de cadera o de rodilla. Poseen una buena resistencia a la corrosión en contacto con fluidos biológicos, gran ductilidad y excelentes propiedades mecánicas, muy superiores a las de los metales puros, las cerámicas o los polímeros. Las aleaciones metálicas más utilizadas en cirugía ortopédica son los aceros inoxidable, las aleaciones de base de cobalto y las aleaciones de titanio.

#### **2.2.1.1. Aleaciones de acero inoxidable**

Los aceros inoxidable están compuestos por una base de hierro con pequeños porcentajes de cromo, molibdeno y níquel. El más utilizado en reparación de hueso es el AISI 316L LVM. Los aceros inoxidable presentan una moderada resistencia a la corrosión y un módulo elástico

mucho más elevado que el del hueso, por lo que la transmisión de cargas entre ambos es muy ineficiente. Por ello, su uso en dispositivos que soportan carga mecánica es limitado y se utilizan en la fabricación de dispositivos temporales como clavos intramedulares, tornillos y placas de osteosíntesis (Geetha, 2009).

#### **2.2.1.2. Aleaciones de base de cobalto**

La aleación con base de cobalto más utilizada es la de Cobalto-Cromo-Molibdeno. Tiene una gran resistencia al desgaste y una elevada dureza, por lo que se utiliza en prótesis articulares que deben soportar fricción como las cabezas de los componentes femorales. Al igual que en el acero inoxidable, su módulo elástico es muy alto y además pueden sufrir corrosión a largo plazo (Geetha, 2009).

#### **2.2.1.3. Aleaciones de titanio**

Las aleaciones de titanio presentan ventajas sobre las anteriores ya que presentan un módulo elástico menor, más cercano al del hueso, y una buena resistencia a la corrosión (Geetha, 2009). El titanio es un material alotrópico pudiendo existir en más de una forma cristalográfica. A temperatura ambiente presenta una estructura hexagonal compacta (fase  $\alpha$ ), mientras que a temperaturas superiores a 882 °C sufre una transformación reversible a una estructura cúbica centrada en el cuerpo (fase  $\beta$ ). La presencia de elementos aleantes como el vanadio o el aluminio cambian la temperatura de transformación, estabilizando una u otra fase. Así, la adición de elementos aleantes posibilita la modificación de las propiedades estructurales del titanio. En concreto, la adición de aluminio y vanadio proporciona mayor resistencia a la fatiga. Es por ello que el titanio puro ha sido sustituido por la aleación Ti6Al4V (Ti64) (90 % de Ti, 6 % de Al, 4 % de V) en aplicaciones que deben soportar carga, como vástagos femorales. Sin embargo, ya que presenta baja resistencia al desgaste, no se utiliza en aplicaciones que implican fricción.

La excelente biocompatibilidad del titanio y de la aleación Ti64 proviene en gran medida de la oxidación superficial que sufren al entrar en contacto con el aire, ya que de manera natural se forma una capa de pasivado de óxido de titanio,  $\text{TiO}_2$ , de pocos nanómetros de espesor. Este óxido superficial está formado principalmente por hidróxidos y anatasa. La anatasa, junto a la brookita y al rutilo, son las tres fases cristalinas en las que se puede encontrar al  $\text{TiO}_2$ , siendo la anatasa la más termodinámicamente estable. Esta capa de óxido superficial proporciona buena resistencia a la corrosión y una baja tasa de liberación de iones. Sin embargo, el prolongado contacto con los fluidos fisiológicos conduce a la desestabilización

de la capa de pasivado, lo que conduce a la disolución del metal subyacente antes de su repasivado y a la liberación de iones metálicos a los tejidos circundantes (Liu, 2004).

### **2.2.2. Modificaciones superficiales de la aleación Ti64**

La adecuada interacción de las células óseas con la superficie del material determinará la exitosa osteointegración del implante. La manufactura industrial del Ti64 genera superficies con topografías poco definidas. Por tanto, es necesario realizar tratamientos superficiales para dotar a la aleación con las propiedades necesarias para su correcta osteointegración.

#### **2.2.2.1. Modificaciones mecánicas**

El objetivo principal de las modificaciones mecánicas es obtener topografías y rugosidades específicas así como eliminar la contaminación superficial. Ejemplos de estas modificaciones son el chorreado con partículas o los procesos de mecanizado o pulido.

#### **2.2.2.2. Modificaciones químicas**

Persiguen modificar la composición química superficial de la aleación con el fin de generar una capa de óxido más estable que mejore la resistencia a la corrosión mediante tratamientos de oxidación térmica, anódica, tratamientos ácidos o alcalinos así como la deposición de diferentes recubrimientos.

Los tratamientos de oxidación térmica generan en la superficie del material una capa enriquecida en óxido de titanio cuya estabilidad es superior a la capa de pasivado. Durante el tratamiento térmico, el titanio difunde hacia el exterior y en contacto con el oxígeno se genera la capa de óxido. Un método de oxidación térmica consiste en introducir toda la pieza en un horno con aire a una temperatura determinada, alrededor de 500-700 °C, formándose una capa de óxido cuyo espesor está directamente relacionado con la temperatura y el tiempo a la que se someta la pieza. La aleación tratada presenta una mayor resistencia a la corrosión (Browne, 1994; García-Alonso, 2003; Barranco, 2007; Barranco, 2010; Barranco, 2011), disminuye la liberación de iones (Saldaña, 2006) y mejora la interacción con células formadoras de hueso (García-Alonso, 2003; Saldaña, 2005). Una limitación de los métodos de oxidación térmica en los que se trata toda la pieza es que pueden conducir a una alteración de la estabilidad global de su microestructura así como a la relajación de tensiones residuales de compresión en la subsuperficie del material. Un método alternativo de oxidación térmica es el procesado mediante percusión con láser ("Laser Peening", LP), en el que se incide un haz de láser de alta energía sobre la superficie del material (Carreón, 2014). El efecto neto es el desarrollo de un estrés compresivo residual a mayores profundidades que el generado con

procedimientos convencionales como el “shot peening” o el granallado, lo que dificulta la propagación de grietas, mejorando así el desgaste por fatiga del material (Montross, 2002). Para incrementar la eficiencia del procedimiento, las muestras se recubren de una capa opaca al láser, conocida como capa de sacrificio o de ablación, confinándose en un medio transparente, frecuentemente agua. Al incidir el láser sobre la capa de sacrificio se produce un calentamiento que vaporiza el material, alcanzándose rápidamente temperaturas superiores a varias decenas de miles de grados que transforman el vapor en plasma. La expansión hidrodinámica del plasma caliente en la región confinada crea pulsos de presión sobre el material de alta amplitud y corta duración. Dependiendo de los parámetros empleados durante la irradiación y de las características del material, su topografía superficial puede sufrir alteraciones. A diferencia de la oxidación térmica en horno, el procesamiento mediante LP permite tratar zonas de interés en la superficie de la pieza evitando modificar la estructura del material.

La tecnología LP se desarrolló para mejorar el comportamiento a fatiga de componentes metálicos empleados en la industria aeronáutica y de la automoción. Su posible uso en el tratamiento de aleaciones biomédicas fue propuesto hace casi dos décadas (Clauer, 1996). El fracaso por fatiga afecta a materiales metálicos empleados en la fabricación de prótesis ortopédicas e implantes dentales, incluyendo la aleación Ti64 (Baxmann, 2013; Chao, 2007; Magnissalis, 2003; Shemtov-Yona, 2014). El tratamiento mediante LP ha sido ensayado en la aleación Ti64, observándose que mejora sus propiedades mecánicas (Altenberger, 2012; Guo, 2011; Nalla, 2003). Para su uso en aplicaciones biomédicas, el tratamiento LP no puede ser realizado usando capas de sacrificio, que podrían contaminar la superficie del material. En ausencia de dichas capas, el calentamiento en la superficie de la aleación será extremadamente alto, lo que conducirá a su oxidación. Hasta la fecha no se han descrito en detalle las modificaciones químicas y/o topográficas que experimenta la superficie de la aleación Ti64 modificada mediante LP. Asimismo, se desconoce si las células formadoras de hueso son capaces de interaccionar adecuadamente con dicha superficie.

### **2.3. Aleación Ti64 porosa para regeneración y reparación ósea**

Como se ha comentado, muchos de los materiales diseñados para ingeniería tisular ósea carecen de las propiedades adecuadas para aportar la necesaria estabilidad mecánica. El desarrollo de materiales metálicos porosos constituye una alternativa a estas limitaciones. Por un lado, los metales poseen mejores propiedades mecánicas y, gracias al desarrollo de nuevas técnicas como el sinterizado metálico, se pueden obtener soportes metálicos con una porosidad controlada. El sinterizado metálico, que usa un haz de electrones o un láser, funde

selectivamente polvo metálico depositado capa por capa gracias a un programa informático basado en tecnología de impresión 3D. Esta técnica permite además diseñar de forma personalizada la estructura tridimensional de la pieza a partir de tomografías computarizadas de los defectos óseos de cada paciente.

Uno de los problemas en el fallo de los implantes es la falta de osteointegración por una mala interacción entre las células y el material. Incluso aunque exista una buena osteointegración en el corto-medio plazo, la diferencia entre los valores del módulo elástico del hueso y del material conduce en ocasiones a una mala transmisión de las cargas mecánicas que puede provocar la reabsorción del tejido y el fracaso del implante, fenómeno conocido como apantallamiento de tensiones o “stress shielding”. Los implantes metálicos porosos para ingeniería tisular ósea proporcionan la estabilidad mecánica necesaria durante las primeras fases postimplantación, favoreciendo la transmisión de cargas en virtud a que estos soportes poseen un módulo elástico más cercano al del hueso. En este sentido, en un estudio en el que se implantaron soportes porosos de Ti64 en defectos críticos en fémures de ratas, se detectó una adecuada formación de hueso en todo el volumen del soporte que se correlacionó con una mayor estabilidad mecánica (Van der Stok, 2013).

### **3. ADHESIÓN Y RESPUESTA CELULAR FRENTE A LAS PROPIEDADES SUPERFICIALES DE LOS MATERIALES**

En el momento de la implantación, la superficie del material entra en contacto con el agua y las proteínas de los fluidos fisiológicos. Si las propiedades superficiales son adecuadas, las proteínas se adsorberán al material (Harvey, 2013). Posteriormente, las células interactúan con la capa proteica adherida a la superficie del material mediante uniones débiles no específicas. A continuación se formarán interacciones adhesivas más fuertes mediadas por las integrinas, proteínas de membrana que reconocen dominios específicos de las proteínas de la ECM. Dependiendo de la densidad de las adhesiones y su distribución, la célula forma complejos moleculares más estables denominados adhesiones focales que conectan las proteínas extracelulares con el citoesqueleto celular. Finalmente, las adhesiones focales se agrupan formando complejos de mayor envergadura y se inician cascadas de señalización que modulan procesos celulares como la proliferación, migración o diferenciación (Ventre, 2012). Existen numerosos estudios que abordan el efecto que tienen la topografía y la composición química de la superficie sobre la conformación de las proteínas de la ECM y por tanto en la formación de las adhesiones focales y el posterior comportamiento celular. Por ejemplo, se ha observado que topografías que provocan una separación mayor de 108 nm entre los dominios de unión de las proteínas de la ECM, provocan la formación de adhesiones focales pequeñas

que pueden frenar la transducción de las señales responsables de la proliferación y migración celular (Cavalcanti-Adam, 2007).

Las integrinas están compuestas por dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que se unen formando un heterodímero. Existen 18 tipos de la subunidad  $\alpha$  y 8 tipos de la subunidad  $\beta$  que se unen para dar lugar a múltiples combinaciones  $\alpha\beta$ . Ambas subunidades poseen un dominio extracelular que se une específicamente a proteínas de la ECM, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que interactúa con otras proteínas intracelulares (Gahmberg, 2009; Giancotti, 1999). La unión entre las proteínas de la matriz extracelular y las integrinas genera un cambio conformacional que permite al dominio intracelular de la subunidad  $\beta$  interactuar con otras proteínas, formándose así las adhesiones focales e iniciándose las diferentes cascadas de señalización que controlan procesos de adhesión, proliferación, migración o diferenciación celular (Askari, 2009; Ventre, 2012). Dado que carecen de actividad enzimática, las integrinas deben reclutar proteínas que regulen estos procesos. Las proteínas reclutadas pueden dividirse en proteínas de unión a integrina, como la talina, proteínas adaptadoras que carecen de actividad enzimática como paxilina o vinculina, o proteínas con actividad enzimática como la quinasa de adhesión focal o FAK (Berrier, 2007).

FAK es uno de los componentes más importantes de las adhesiones focales. Su unión con la subunidad  $\beta$  de las integrinas provoca su autofosforilación en la tirosina 397 (p-FAK Y397), lo que propicia el reclutamiento de proteínas que contienen dominios SH2 y SH3 que, a través de cascadas de fosforilaciones, activarán otros residuos de FAK y a otras proteínas como paxilina (Lim, 2007a). Ésta es una proteína adaptadora que, tras unirse a FAK, es capaz de activar diferentes moléculas como las GTPasas Rho que actúan como interruptores moleculares, oscilando entre un estado inactivo y activo, y que están implicadas tanto en la organización del citoesqueleto como en rutas de señalización que regulan la proliferación y diferenciación celular. La mayoría de las fosforilaciones que sufre FAK provocan su activación. Sin embargo, la fosforilación de FAK en la tirosina 407 (p-FAK Y407) conlleva una disminución en su actividad y una regulación negativa de la adhesión y proliferación celular (Lim, 2007a; Saldaña, 2010). La topografía y la composición química de los materiales pueden modular la expresión y actividad de FAK. Saldaña y col. (2005) detectaron mayores niveles de FAK en osteoblastos cultivados sobre Ti64 oxidado térmicamente que en la aleación sin tratar, así como una diferente reorganización de la proteína. Okumura y col. (2001) observaron que la expresión de FAK en células cultivadas sobre superficies rugosas de titanio era mayor que en células cultivadas sobre vidrio. También se detectó que la fosforilación de FAK en la tirosina 397 era mayor en osteoblastos cultivados sobre superficies de silicona con crestas y surcos que en superficies lisas (Hamilton, 2007). Las características superficiales no sólo modulan la

actividad de FAK sino también la de las proteínas asociadas a ella. Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio indicaron que el cultivo de MSC y osteoblastos sobre aleaciones de Ti64 con surcos micrométricos modificaba la actividad de las moléculas de señalización Rho y su efector ROCK, provocando cambios en la maduración celular (Calzado-Martín, 2011; Calzado-Martín, 2014). También la composición química superficial afecta a la formación de las adhesiones focales. Así se observó un incremento en el reclutamiento de paxilina en contactos focales de células osteoblásticas cultivadas en superficies funcionalizadas con grupos  $-OH$ , mientras que en superficies con grupos  $-CH_3$  se observó un descenso en los niveles de la proteína (Keselowsky, 2004).

El proceso de adhesión celular regula el ensamblaje del citoesqueleto celular que constituye el soporte estructural de la célula. Está formado por filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios que forman una intrincada red que se reorganiza en función de las características químicas y topográficas de la superficie del material al que se ha adherido la célula. Existen numerosos estudios sobre el efecto que tienen dichas características en la reorganización del citoesqueleto y en el posterior destino de la célula. Así Kilian y col. (2010), tras cultivar MSC en superficies con motivos rectangulares o pentagonales que modulaban la contractilidad del citoesqueleto, observaron que las células mostraban distintos patrones de diferenciación dependiendo de la forma que tomaran. Mediante análisis de expresión de proteínas e inhibición de vías de señalización demostraron que aquellas topografías que promovían una estructura del citoesqueleto más contráctil favorecen la osteogénesis a través de la vía de señalización mediada por Wnt. También las características químicas de la superficie pueden modular el grado de mineralización. Por ejemplo, las células osteoblásticas cultivadas sobre superficies funcionalizadas con grupos  $-OH$  o  $-NH_2$  presentan un mayor grado de mineralización que las cultivadas sobre superficies con grupos  $-COOH$  o  $-CH_3$  (Keselowsky, 2004).

En conclusión, los numerosos estudios publicados hasta la fecha indican que la combinación de las características topográficas y químicas de los materiales condiciona el comportamiento de las células que interaccionan con ellos.



## ***OBJETIVOS***



En base a los antecedentes expuestos, los objetivos propuestos para el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes:

1. Evaluar el efecto del tratamiento superficial mediante percusión con láser de la aleación Ti6Al4V sobre la adhesión, viabilidad y maduración osteogénica de células humanas del linaje osteoblástico.
2. Evaluar el efecto de las características topográficas y químicas de diversos biomateriales en su interacción con células madre mesenquimales humanas así como su influencia en la relación paracrina que estas células establecen con células osteoblásticas, células madre mesenquimales y células endoteliales humanas.



## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

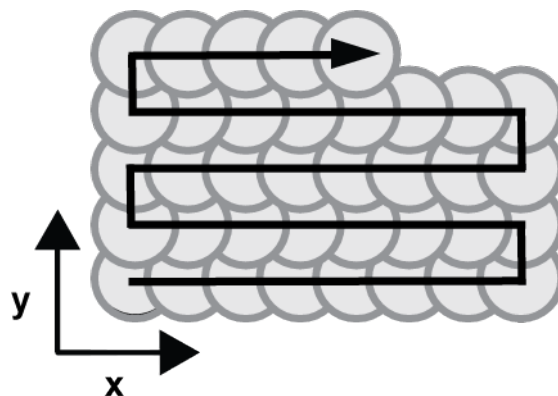


## 1. MATERIALES ENSAYADOS

Este trabajo se ha realizado utilizando los materiales que se detallan a continuación:

- Inserto (Corning, Life Science, Tewksbury, MA, EE. UU.): contiene una membrana de poliéster de 24 mm de diámetro con un elevado número de poros en su superficie ( $1 \times 10^6$  poros/cm<sup>2</sup>). Se utiliza para la realización de ensayos de cocultivo indirecto de dos poblaciones celulares, ya que permite el intercambio paracrino de factores solubles sin que haya contacto físico entre los dos tipos celulares que se cocultivan. En este trabajo la membrana del inserto ha sido denominada “soporte liso”.
- Sustrato de poliestireno con un 90 % de porosidad (Alvetex, Reinnervate, Sedgfield, Reino Unido). Se presenta en forma de discos de 200 µm de espesor y 22,1 mm de diámetro. En este trabajo este sustrato ha sido denominado “soporte poroso”.
- Sustratos porosos de la aleación Ti64, conformados como discos de 20 mm de diámetro y 4 mm de altura con un tamaño de poro de 900 µm. Estos materiales fueron generados en el Instituto Tecnológico de Canarias mediante sinterización, utilizando la técnica conocida como fusión por haz de electrones (“electron beam melting”).
- Hidrogeles de fibrina: Estas matrices se conforman mediante una reacción de policondensación a partir de fibrinógeno en presencia de trombina, una proteasa que elimina los polipéptidos del fibrinógeno que previenen su polimerización. El resultado es una red tridimensional de fibras de fibrina que permiten el crecimiento celular.
- Sustratos de la aleación Ti64 ELI (“extra low interstitial”) conformados como discos de 20 mm de diámetro y 2 mm de espesor y sometidos a diferentes tratamientos superficiales en el Departamento de Metalurgia Física del Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas (CENIM-CSIC, Madrid) y en el Centro Tecnológico AIMEN (Porriño, Pontevedra). Los discos denominados Ti64 o “soportes lisos de Ti64” se lijaron sucesivamente con papeles de lija de carburo de silicio de finura de grano creciente y se pulieron mecánicamente con pasta de diamante de 1 µm hasta alcanzar un acabado de espejo. Otro grupo de discos se lijó con papeles de lija de tamaño de grano 2400 y a continuación se sometió a tratamiento de percusión con láser (“Laser Peening”, LP) empleando un equipo Q-switched Nd-YAG laser PRO 290-30 (Quanta Ray Spectra Physics, Santa Clara, CA, EE. UU.), usando agua como medio confinante. Este equipo opera con luz infrarroja ( $\lambda=1064$  nm) y luz verde ( $\lambda=532$  nm) y trabaja con una energía por pulso de hasta 1,6 J, generando pulsos de 10 ns con una frecuencia de 30 Hz. Las muestras se dispusieron en un soporte que, mediante un sistema informático, permite su desplazamiento en los ejes XYZ. El haz de láser se focaliza mediante un espejo que genera pulsos de láser de 2,4 mm de diámetro que inciden sobre la superficie de la muestra,

superponiéndose un 80 % (Esquema 1). En función de la densidad de pulsos láser empleada, 421 pulsos/cm<sup>2</sup> o 2.524 pulsos/cm<sup>2</sup>, se generaron dos tipos de muestras que se denominaron Ti64 LP1 y Ti64 LP2, respectivamente.



Esquema 1. Trayectoria de los pulsos del láser sobre la superficie de Ti64

### 1.1. Caracterización de los materiales ensayados

La caracterización de los soportes lisos de poliéster, soportes porosos de poliestireno, plástico de cultivos e hidrogeles de fibrina se realizó en el Grupo de Superficies y Partículas Nanoestructuradas del Instituto de Nanociencia de Aragón (NFP-INA, Zaragoza). Los materiales se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, “scanning electronic microscopy”) utilizando un equipo FEI Quanta 200 (Inspect FEI, Hillsboro, OR, EE. UU.). Para la visualización de los hidrogeles de fibrina, éstos se sumergieron en agua durante 24 h para eliminar las sales, congelándose a continuación en nitrógeno líquido. Se realizó un corte en el material y la estructura porosa del interior del hidrogel se examinó mediante SEM. El tamaño de los poros de los soportes lisos y porosos se determinó empleando las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica. Para ello, se cuantificó el diámetro o el área de los poros en los soportes lisos o porosos, respectivamente, haciendo uso del programa ImageJ v1.34. A partir del área de los poros se calculó el diámetro del círculo equivalente. La rugosidad del plástico de cultivos y los soportes lisos se analizó utilizando un perfilómetro optoelectrónico P-6 Stylus Profiler (KLA-Tencor Corporation, Milpitas, CA, EE. UU.).

La caracterización de la topografía y composición química de las superficies de Ti64 y modificadas con láser, Ti64 LP1 y Ti64 LP2, se realizó en el Departamento de Metalurgia Física del Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas (CENIM-CSIC, Madrid) y en el grupo de Superficies e Interfases del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Extremadura. La caracterización del aspecto superficial y de las secciones transversales de los materiales se realizó mediante SEM utilizando un equipo Hitachi High-Tech (Hitachi High



Technologies America, Schaumburg, IL, EE. UU.). El análisis morfológico superficial de las muestras se realizó mediante detección de electrones secundarios empleando un voltaje de aceleración de 10-15 kV y una distancia de trabajo de 10-15 mm. Las secciones transversales se investigaron utilizando un detector de electrones retrodispersados que proporcionan información cristalográfica de las muestras, empleando un voltaje de aceleración de 10 kV y una distancia de trabajo entre 7 y 10 mm. Las fases cristalinas presentes en las muestras se estudiaron mediante difracción de rayos X (DRX) utilizando un difractómetro de rayos X convencional D8 Discover (Bruker AXS, Karlsruhe, Alemania) dotado con un detector lineal Lynxeye, un puntero láser controlado por videocámara para asegurar la correcta colocación y altura de la muestra,  $\frac{1}{4}$  de círculo de Euler, tubo de cobalto sometido a una corriente de 30 mA y a una tensión de 40 KV, y espejo Göbel.

La topografía de las aleaciones se estudió mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), empleando un microscopio Agilent AFM 5500 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), trabajando en modo contacto, a temperatura ambiente y utilizando micropalancas con una constante de fuerza 0.03 N/m y punta de silicio de radio  $\sim 8$  nm (CSC38 Series, Mikromasch, Lady's Island, SC, EE. UU.). Las imágenes se tomaron en el aire y la fuerza aplicada se mantuvo por debajo de 1 nN con una velocidad de barrido de 2 Hz. Para cada muestra se tomaron cinco imágenes de diferentes localizaciones, siendo el área escaneada de  $20 \times 20 \mu\text{m}$ . La media cuadrática de la rugosidad ( $R_{\text{rms}}$ ) asociada a cada imagen se calculó usando el programa Gwyddion v 2.26 (David Nečas y Petr Klapetek, República Checa).

La caracterización de la química superficial y subsuperficial de los materiales se realizó mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), empleando un espectrómetro de fotoelectrones K-alpha (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) equipado con una fuente monocromática de rayos X Al K $\alpha$  (1486,7 eV). El área de la superficie de la muestra analizada fue de  $0,16 \text{ mm}^2$ . Las muestras se estudiaron bajo condiciones de ultra alto vacío ( $3,5 \times 10^{-8}$  mbar), bombardeándose previamente con  $\text{Ar}^+$  (3 keV) durante 5 s para reducir la contaminación con carbono. Se obtuvieron espectros de alta resolución correspondientes a O1s, C1s, Al2p y Ti2p, deconvolucionándose sus perfiles para identificar el estado químico de los óxidos de las muestras.

Las muestras se analizaron asimismo mediante espectrometría de masas de iones secundarios por tiempo de vuelo (ToF-Sims, "Time of flight secondary ion mass spectrometry") utilizando un espectrómetro TOF-Sims5 (ION-TOF GmbH, Münster, Alemania) equipado con un cañón primario de  $\text{Bi}^+$  operado a 25 kV. La dosis total de iones utilizada para adquirir cada espectro estuvo por encima de  $10^{12}$  iones/ $\text{cm}^2$ . Los espectros en modo de iones negativos se obtuvieron desde 0 a 850 uma. El perfil en profundidad se realizó rastreando un área de  $250 \times$

250  $\mu\text{m}$  con un haz de 2 KV de  $\text{Cs}^+$  durante 5 min en el caso de Ti64 o de 40 min para las LP, debido a su elevada dureza. Para la neutralización de la carga de las muestras se utilizó una pistola de electrones de baja energía. Los iones secundarios analizados fueron  $\text{OH}^-$ ,  $\text{AlO}^-$ ,  $\text{TiO}^-$  y  $\text{TiO}_2^-$ . El grosor de la capa de óxido se determinó en el laboratorio de Nanomecánica y Caracterización Nanométrica de la Universidad Rey Juan Carlos, mediante perfilometría óptica empleando un equipo Zeta-20 (Zeta Instruments, San José, CA, EE. UU.).

## 2. CULTIVOS CELULARES

Para la realización de este trabajo se han empleado células madre mesenquimales humanas aisladas de médula ósea (hMSC) disponibles comercialmente (Lonza, Walkersville, MD, EE. UU.). Las hMSC se expandieron en un medio de crecimiento definido, comercializado por el mismo distribuidor, que consiste en medio basal suplementado con SingleQuots conteniendo suero fetal bovino (FBS), L-glutamina y penicilina/estreptomicina. Para la realización de los experimentos las células se usaron como máximo en pase 7-8.

Los cultivos primarios de osteoblastos humanos (hOB) se establecieron a partir de hueso trabecular procedente de explantes óseos de pacientes sometidos a artroplastias de rodilla en el Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica A del Hospital Universitario La Paz. El intervalo de edad de los pacientes incluidos en el estudio estuvo comprendido entre 70 y 80 años. Ninguno de los pacientes incluidos en este estudio presentaba en el momento de la intervención signo bioquímico indicativo de alteraciones metabólicas óseas. Los fragmentos de hueso trabecular fueron troceados en piezas con tamaños comprendidos entre 0,3 y 0,5  $\text{cm}^2$  y lavados exhaustivamente con una solución salina tamponada de fosfato (PBS). Los fragmentos se cultivaron en medio DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium", Lonza) suplementado con FBS al 15 % (Lonza) descomplementado mediante calentamiento a 56 °C durante 30 min, 100 UI/ml de penicilina (Invitrogen, Barcelona, España) y estreptomicina al 0,1 mg/ml (Invitrogen). Para llevar a cabo los experimentos, las células se usaron como máximo en pase 2.

Las células humanas endoteliales de vena del cordón umbilical (HUVEC), disponibles comercialmente (Lonza), se expandieron en el medio definido EGM-2 que consiste en medio basal suplementado con SingleQuots conteniendo FBS al 2 %, hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos humano (FGF), factor de crecimiento vasculoendotelial humano (VEGF), factor de crecimiento insulínico humano (R3-IGF-1), ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico humano (EGF), gentamicina, anfotericina B y heparina. Las placas utilizadas para el cultivo de células HUVEC se recubrieron con una solución de colágeno bovino (Sigma-Aldrich, Madrid, España) disuelto en PBS al 0,1 %, que se depositó durante 2 h a

temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó la solución de colágeno y las placas se lavaron con PBS un par de veces. Para la realización de los experimentos, las células se usaron como máximo en pase 6.

Todas las células se cultivaron a 37 °C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % y 95 % de humedad relativa.

### 2.1. Cultivos celulares en los materiales

En los soportes lisos (insertos) se sembraron  $5 \times 10^5$  hMSC en 3 ml de DMEM suplementado con FBS al 15 % (DMEM FBS 15 %). En los soportes porosos, las hMSC se sembraron siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar se añadió a los materiales 1 ml de etanol al 70 %, previamente filtrado, con el fin de hidrofilarlos. A continuación, se lavaron exhaustivamente con PBS y sobre cada sustrato se sembraron  $5 \times 10^5$  hMSC resuspendidas en 200  $\mu$ l de DMEM FBS 15 %. Al cabo de 3 h se añadieron 2 ml de DMEM FBS 15 %.

En los discos de Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2 se sembraron  $5 \times 10^5$  hMSC u hOB para llevar a cabo los ensayos de adhesión, viabilidad y cocultivos, o  $2 \times 10^5$  hMSC u hOB para realizar ensayos de inmunofluorescencia o de microscopía electrónica de barrido. En todos los casos las células se cultivaron en 1 ml de DMEM FBS 15 %.

Los discos porosos de Ti64 se colocaron en placas de 12 pocillos (Corning), sembrándose sobre cada disco  $5 \times 10^5$  hMSC resuspendidas en 2 ml de medio DMEM FBS 15 %. Para favorecer una siembra homogénea de las células, los discos se mantuvieron durante 2 h en agitación orbital a 100 rpm en el interior de un incubador de cultivo.

Para la preparación de los hidrogeles de fibrina, el fibrinógeno bovino (Sigma-Aldrich) se disolvió en DMEM a una concentración de 10 mg/ml. A 1,3 ml de esta solución, se añadieron  $5 \times 10^5$  hMSC resuspendidas en 0,2 ml de DMEM y trombina bovina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 2 U/ml. La suspensión celular se dispuso en un pocillo de una placa de 12 pocillos y se mantuvo a 37 °C durante 45 min para permitir la gelificación. Una vez conformado el hidrogel, se añadieron 1,5 ml de DMEM FBS 15 %.

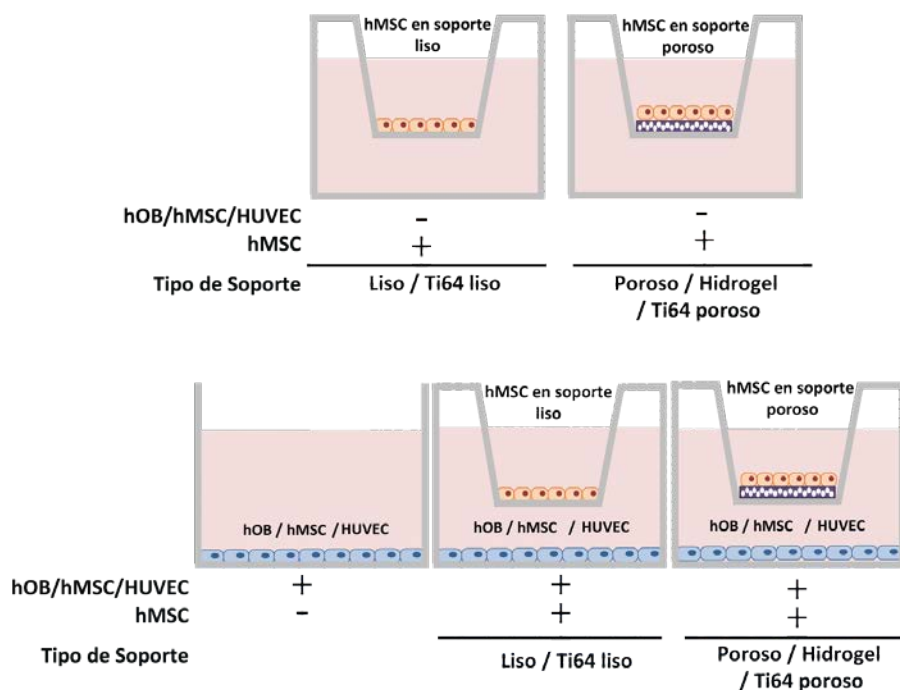
### 2.2. Cocultivos

Para el establecimiento de los diferentes cocultivos, se sembraron  $1 \times 10^6$  hOB o HUVEC, o  $1 \times 10^5$  hMSC en placas de 6 pocillos (Corning). Los hOB y hMSC se incubaron en DMEM FBS 15 % y las células HUVEC en EGM-2. En paralelo, se sembraron  $5 \times 10^5$  hMSC en DMEM FBS 15 % en los diferentes materiales (soporte liso, soporte poroso, hidrogeles de fibrina o discos de Ti64 lisos o porosos). Al cabo de 24 h, las hMSC sembradas sobre los diferentes soportes se lavaron con PBS y los materiales se dispusieron sobre insertos vacíos. A continuación, tanto los insertos

sobre los que se habían sembrado directamente hMSC como los insertos que albergaban materiales en los que se habían sembrado hMSC, se colocaron sobre los pocillos en los que se habían sembrado previamente hOB, hMSC o HUVEC. A continuación se añadieron 3 ml de medio DMEM FBS 15 % o, en el caso de determinados cocultivos de hOB y hMSC, de medio osteogénico. Este medio consistió en DMEM FBS 15 % suplementado con dexametasona  $10^{-7}$  M, ácido ascórbico  $3 \times 10^{-4}$  M y  $\beta$ -glicerolfostato  $10^{-2}$  M (todos de Sigma-Aldrich). En los cocultivos de hMSC sembradas sobre diferentes soportes y hOB o hMSC, se recogió 1/3 del medio de cultivo tras 7 días de incubación, se suplementó con medio fresco y se prolongó la incubación hasta 14 días. Los cocultivos de hMSC y HUVEC se incubaron durante 7 días.

Las diferentes condiciones experimentales se muestran en el esquema 2 y son las que siguen:

- hMSC sembradas sobre soporte liso, soporte poroso, hidrogeles de fibrina o discos de Ti64 lisos o porosos.
- Cultivos de hOB, hMSC o HUVEC sembrados en plástico de cultivos.
- Cocultivos de hMSC sembradas sobre soporte liso, soporte poroso, hidrogeles de fibrina o discos de Ti64 lisos o porosos y hOB, hMSC o HUVEC sembrados en plástico de cultivo.



Esquema 2. Condiciones ensayadas en experimentos de cocultivo de hOB, hMSC o HUVEC y células hMSC sembradas en diferentes soportes.

### 2.3. Viabilidad celular

Para la realización de estos ensayos, las células se cultivaron en los correspondientes sustratos hasta un máximo de 14 días. Para la determinación de la viabilidad de células cocultivadas, los insertos se dispusieron en una placa de 6 pocillos y el medio del cocultivo se transfirió a un tubo estéril, almacenándose durante el tiempo del ensayo a 37 °C. Para cuantificar la viabilidad celular, se utilizó el reactivo alamarBlue (Biosource, Nivelles, Bélgica). Este reactivo contiene un indicador redox que cambia de color en respuesta a la actividad metabólica de la célula. Las células se lavaron con PBS y se incubaron a 37 °C en DMEM libre de rojo fenol suplementado con FBS al 15 % y reactivo alamarBlue al 10 %. Tras 3 h de incubación, el medio de cultivo se recogió y se cuantificó la fluorescencia emitida a 590 nm tras excitar la muestra de medio a 530 nm, en un espectrofluorímetro Synergy4 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.).

### 2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para su visualización en el microscopio electrónico de barrido, las células adheridas a los materiales se lavaron con PBS y se fijaron durante 1 h a temperatura ambiente con glutaraldehído diluido en PBS al 2,5 %. A continuación se deshidrataron en soluciones de concentración creciente de etanol (30-100 %) disuelto en agua y se secaron mediante el método de punto crítico con CO<sub>2</sub> empleando un dispositivo CPD7501 (Quorum Technology, Laughton, Reino Unido). Una vez secas, las muestras se recubrieron con oro empleando un equipo Sputter Coater SC510 (Bio-Rad, Berkeley, CA, EE. UU.) y se examinaron en un microscopio electrónico de barrido (Inspect FEI).

### 2.5. Ensayos de inmunofluorescencia

Las células adheridas a los materiales se fijaron durante 20 min con paraformaldehído al 4 % en PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1 % en PBS durante 10 min. Las células se incubaron durante 1 h en PBS conteniendo seroalbúmina bovina (BSA) al 2 % y Tween 20 al 0,05 % (ambos de Sigma-Aldrich). A continuación, las células se incubaron con los anticuerpos indicados en la Tabla 1, diluidos en PBS conteniendo BSA al 1 %.

Anticuerpo primario	Dilución	Tiempo de incubación	Casa comercial	Anticuerpo secundario
Paxilina	1:200	16 h	Becton Dickinson Bioscience, CA, EE. UU.	Anti-IgG ratón-Alexa Fluor 488
p-FAK Y397	1:50	1 h	Chemicon, Harrow, Reino Unido	Anti-IgG ratón-Alexa Fluor 488
p-FAK Y407	1:50	1 h	Biosource	Anti-IgG conejo-Alexa Fluor 488
Fibronectina	1:100	1 h	Chemicon	Anti-IgG ratón-Alexa Fluor 488

**Tabla 1.** Relación de anticuerpos primarios y secundarios empleados en los ensayos de caracterización celular.

Tras ser lavadas con PBS conteniendo Tween 20 al 0,05 %, las células se incubaron durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a un fluorocromo (Alexa Fluor 488, Molecular Probes Europe BV, Leiden, Holanda) diluido 1:1000 en PBS conteniendo BSA al 1 %. Las células se volvieron a lavar con PBS conteniendo Tween 20 al 0,05 % y se incubaron con faloidina  $4 \times 10^{-7}$  M conjugada con isotiocianato de tetrametil-rodamina (Sigma-Aldrich), diluida 1:300 en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, las células se examinaron utilizando un microscopio confocal espectral (Leica TCS SPE, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania).

Para la determinación del tamaño de las adhesiones focales, las células se cultivaron durante 4, 15 y 24 h en los discos de Ti64, Ti64 LP1 o Ti64 LP2 y a continuación se realizó una tinción de paxilina como se describe en el párrafo anterior. A partir de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal y haciendo uso del programa ImageJ v1.34, se cuantificó la longitud de 250 señales de paxilina en las células, a partir de 3 imágenes elegidas al azar de cada condición experimental.

## 2.6. Ensayos de adhesión celular

Para la realización de los ensayos de adhesión celular a los diferentes materiales, las células se sembraron y se cultivaron durante 2, 4, 15 ó 24 h en DMEM FBS 15 %. A continuación, las células adheridas se lavaron con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % en PBS durante 1 h. Las células se observaron en un microscopio confocal (Leica TCS SPE), pudiéndose detectar en virtud de la señal de autofluorescencia emitida tras el tratamiento con el agente fijador. Se tomaron 10 fotos representativas, cada una de una superficie de  $727 \times 727 \mu\text{m}$ , y se realizó un recuento del número de células adheridas, empleando el programa ImageJ v1.34. Además, se seleccionaron de forma aleatoria un total de 100 células a partir de las 10 imágenes y se cuantificó el área celular usando el mismo programa.

La firmeza de la adhesión celular a los diferentes materiales fue determinada tras 15 h de incubación. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 min con PBS conteniendo EDTA  $5 \times 10^{-4}$  M. Las células se lavaron varias veces con PBS, cuantificándose a continuación la viabilidad de las células adheridas mediante el uso del reactivo alamarBlue, como se detalla en el apartado 2.3.

## 2.7. Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina (FA)

Para la cuantificación de la actividad FA, las células se lavaron con PBS y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 min, en fuerte agitación, con 350  $\mu\text{l}$  de una solución de extracción que contenía Tris-HCl  $5 \times 10^{-2}$  M pH 8,0, NaCl  $5 \times 10^{-1}$  M, Tritón X-100 al 1 % y una mezcla de inhibidores de

proteasas (bacitracina a 50 ng/ml, aprotinina a 2 ng/ml, fluoruro de fenilmetilsulfonilo a  $17,4 \times 10^3$  ng/ml y pepstatina A a 1 ng/ml, todas ellas de Sigma-Aldrich). Los extractos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes se alicuotaron y almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. En el caso de hMSC cultivadas sobre soportes lisos o porosos, el soporte poroso y la membrana del inserto se separaron del inserto empleando un bisturí y se introdujeron en un tubo de microcentrífuga, añadiéndose 350  $\mu\text{l}$  de la solución de extracción y manteniéndose en hielo con fuerte agitación durante 30 min. Cada 10 min, los tubos se cambiaron de posición para favorecer el proceso de extracción. Los tubos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes se alicuotaron y almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

La actividad FA se cuantificó en los extractos totales de proteínas mediante el empleo de una reacción colorimétrica. En esta reacción la enzima cataliza la hidrólisis del sustrato *p*-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich) a  $37^\circ\text{C}$  y pH 10,5, dando lugar al cromógeno *p*-nitrofenol. La absorbancia a 450 nm, proporcional a la actividad de la enzima FA, se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Synergy4. Los valores obtenidos se normalizaron de acuerdo a la cantidad total de proteínas presentes en los extractos, cuantificadas mediante el método de Bradford (Bio-Rad, Berkeley, CA, EE. UU), utilizando BSA como estándar.

## 2.8. Cuantificación de la formación de nódulos minerales

Para la realización de estos ensayos, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 1 h con etanol al 70 %. Posteriormente se incubaron durante 30 min con una solución acuosa conteniendo rojo de alizarina (Sigma-Aldrich)  $4 \times 10^{-2}$  M a pH 4,2. Tras lavar exhaustivamente con agua, el colorante se eluyó utilizando cetilpiridinio al 10 % (p/v) en tampón fosfato sódico 10 mM y pH 7. La absorbancia a 620 nm se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Synergy4.

## 2.9. Detección de la secreción de FN, COLI, OPG, RANKLs, M-CSF, TGF- $\beta$ 1, VEGF, Flt-1 y p-FAK Y397

Los niveles de FN, COLI, OPG, RANKLs, M-CSF, VEGF y Flt-1 se cuantificaron en los medios de cultivo que se recolectaron y centrifugaron durante 5 min a 2.000 rpm, añadiéndose a los sobrenadantes la mezcla de inhibidores de proteasas descrita en el apartado 2.7. Estos sobrenadantes se alicuotaron y almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. En el caso de TGF- $\beta$ 1, los niveles se cuantificaron en extractos de proteínas obtenidos como se especifica en la sección 2.7. Para cuantificar los niveles de p-FAK Y397, las células se lavaron con PBS y se recogió la monocapa de células con ayuda de un raspador. A continuación las células se centrifugaron a

1.700 rpm durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron en 20 µl de una solución que contenía Tris pH 7,4  $10^{-2}$  M, NaCl  $10^{-1}$  M, EDTA  $10^{-3}$  M, EGTA  $10^{-3}$  M, NaF  $10^{-3}$  M,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$   $2 \times 10^{-2}$  M,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$   $2 \times 10^{-3}$  M, Triton X-100 al 1 %, glicerol al 10 %, SDS al 0,1 %, deoxicolato al 0,5 % y el cóctel de inhibidores de proteasas ya descrito. Los extractos se incubaron durante 30 min en hielo con fuerte agitación, se centrifugaron a 4 °C durante 10 min a 12.000 rpm y los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

La cuantificación de los niveles proteicos se realizó empleando kits comerciales de ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) que emplean anticuerpos específicos (FN: Bender MedSystems GmbH, Viena, Austria; COLI: R&D Systems, Mineápolis, MN, EE. UU.; OPG: Bender MedSystems GmbH; RANKLs: Biomedica Gruppe, Viena, Austria; M-CSF: Abcam, Cambridge, Reino Unido; TGF- $\beta$ 1: RayBiotech, Norcross, GA, EE. UU.; VEGF: R&D Systems; Flt-1: R&D Systems; p-FAK Y397: Invitrogen). Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones de los distribuidores. Los límites de detección para cada proteína están determinados por el propio ensayo y son 0,31 ng/ml para FN; 31,3 pg/ml para COLI; 15,6 pg/ml para OPG; 0,125 pmol/l para RANKLs; 2,74 pg/ml para M-CSF; 0,0823 ng/ml para TGF- $\beta$ 1; 31,2 pg/ml para VEGF; 31,2 pg/ml para Flt-1; y 1,6 U/ml para p-FAK Y397. En el caso de TGF- $\beta$ 1 y p-FAK Y397, los valores obtenidos se normalizaron de acuerdo a la cantidad de proteínas intracelulares, cuantificadas mediante el método de Bradford tal y como se detalla en la Sección 2.7.

## 2.10. Cuantificación de la expresión de *ALPL*, *COL1A1* y *BGLAP*

El ARN total se purificó usando el reactivo TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN complementario (ADNc) se preparó a partir de 1 µg de ARN total mediante una reacción de retrotranscripción empleando como cebador un oligonucleótido (dT)18, usando un kit comercial (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EE. UU.). El ADNc correspondiente a cada gen estudiado se cuantificó mediante PCR cuantitativa (qPCR), utilizando un kit comercial (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Applied Science) y un detector LightCycler (Roche Applied Science). Los niveles de expresión de los genes analizados se normalizaron de acuerdo a la expresión del gen constitutivo de la microglobulina  $\beta$ 2. Los oligonucleótidos específicos empleados para analizar la expresión de cada gen fueron: *ALPL*, cebador directo (D) 5'-GACTAAGAAGCCCTTCACTGCCAT-3' y cebador inverso (I) 5'-GACTGCGCCTGGTAGTTGTT-3'; *COL1A1*, (D) 5'-CGGGCCTCAAGGTATTGCT-3' e (I) 5'-GGGACCTTGTTGCCAGGTT-3'; *BGLAP*, (D) 5'-GATAGGCCTCCTGAAAGCCG-3' e (I) 5'-



GGCGCTACCTGTATCAATGG-3'; microglobulina  $\beta_2$ , (D) 5'-CCAGCAGAGAATGGAAAGTC-3' e (I) 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3'.

### 2.11. Ensayos de migración celular

Para los ensayos de migración celular, se sembraron  $1 \times 10^6$  HUVEC o hMSC en medio EGM-2 o DMEM FBS 15 %, respectivamente, en pocillos de placas de 6 pocillos. Una vez alcanzada la confluencia, las HUVEC se lavaron con PBS y se añadió medio EBM (Lonza), un medio libre de factores de crecimiento, citoquinas y otros suplementos, a excepción de penicilina a 100 UI/ml y estreptomycin 0,1 mg/ml. En el caso de las hMSC, tras haber alcanzado la confluencia, se añadió DMEM suplementado con FBS al 0,5 %, penicilina a 100 UI/ml y estreptomycin a 0,1 mg/ml. El mismo día en el que se añadieron estos medios a las células, se sembraron  $1 \times 10^5$  hMSC en medio DMEM FBS 15 % en los soportes lisos, soportes porosos, hidrogeles de fibrina o Ti64 poroso, como se describe en la sección 2.1. Al cabo de 24 h y haciendo uso de una punta de micropipeta (P200 en el caso de las HUVEC o P1000 en el de las hMSC), se rasgó la monocapa contenida en cada pocillo de placas de 6 pocillos. Las células se lavaron con PBS y en los pocillos conteniendo HUVEC o hMSC se colocaron los insertos, sobre los que se dispusieron los diferentes materiales albergando hMSC. Se establecieron diferentes condiciones experimentales que se muestran en el esquema 3:

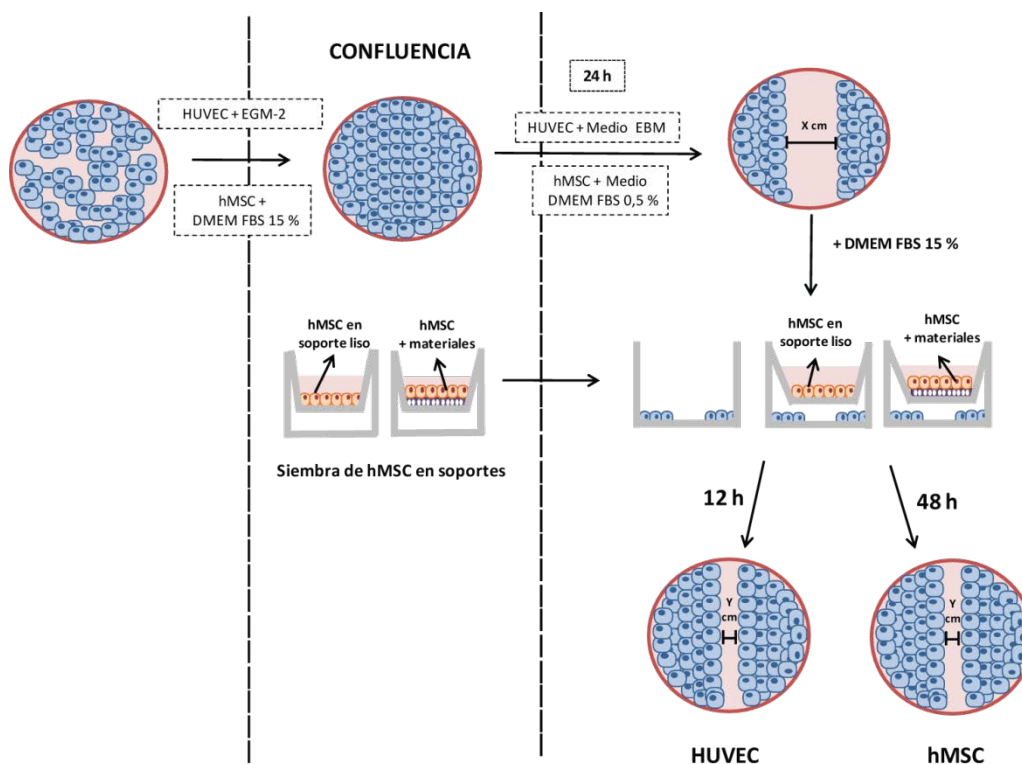
- HUVEC o hMSC cultivadas aisladamente en DMEM FBS 15 %.
- HUVEC o hMSC cocultivadas en DMEM FBS 15 % con hMSC sembradas sobre soportes lisos, soportes porosos, hidrogeles de fibrina o discos porosos de Ti64.

Inmediatamente después de rasgar la monocapa (tiempo 0) y tras 12 h en el caso de las células HUVEC o 48 h en el caso de las hMSC, se tomaron fotos de 4 puntos diferentes de la zona dañada. Para determinar la capacidad de migración celular se cuantificó el área libre de células respecto al tiempo 0 en cada condición experimental, mediante el uso del software ImageJ v1.34.

### 2.12. Ensayos de formación de estructuras tubulares

Se sembraron  $1 \times 10^5$  hMSC en pocillos de placas de 12 pocillos o en soportes porosos, y se incubaron durante 7 días en DMEM FBS 15 %. Los medios se recolectaron, se centrifugaron y los sobrenadantes se emplearon en el ensayo de formación de túbulos. Para ello, se sembraron células HUVEC en medio EGM-2 y una vez alcanzada la confluencia se cultivaron durante 24 h en medio EBM. A continuación se tripsinizaron, resuspendiéndose  $1,25 \times 10^6$  células HUVEC en 1 ml de EGM-2 o de medio procedente de hMSC cultivadas durante 7 días en pocillos o soportes porosos. Estas suspensiones se sembraron en placas de

24 pocillos que contenían 280  $\mu$ l de Matrigel-GFR (Corning) en cada pocillo, gelificado previamente durante 1 h a 37 °C. El Matrigel-GFR es una mezcla gelatinosa de proteínas de membrana y proteínas extracelulares extraídas del sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón que estimula la adhesión y diferenciación en estructuras tubulares de las células endoteliales. Está compuesto por laminina al 60 %, colágeno IV al 30 % y entactina al 8 %, además de factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , EGF e IGF entre otros. Estos factores se encuentran en concentraciones más bajas que en la mezcla de Matrigel, lo que contribuye a evitar la sobreestimulación de las células. Una vez sembradas las células HUVEC sobre Matrigel-GFR, se permitió la formación de estructuras tubulares mediante incubación en los diferentes medios durante 18 h a 37 °C. A continuación, se tomaron 30 fotos de cada pocillo, cuantificándose mediante el empleo del software ImageJ v1.34, el área de todas las estructuras tubulares formadas.



**Esquema 3. Procedimiento experimental empleado en los ensayos de migración celular.** Las células HUVEC o hMSC se sembraron en plástico de cultivo y se cultivaron hasta alcanzar confluencia en medio EGM-2 o en medio DMEM 15 % FBS, respectivamente. A continuación, el medio de cultivo de las células HUVEC se reemplazó por medio EBM y el de las células hMSC por medio DMEM suplementado con suero al 0,5 %. En paralelo, las células hMSC se sembraron sobre los soportes lisos o sobre los diferentes materiales en medio DMEM 15% FBS. Tras 24 h, se rasgó la monocapa de células HUVEC o hMSC tomándose inmediatamente después fotos de la zona dañada (tiempo 0). A continuación se establecieron los cocultivos con las células hMSC sembradas sobre los diferentes materiales y se incubaron en medio DMEM 15% FBS. Tras 12 ó 48 h de incubación, se tomaron fotos de la monocapa de HUVEC o hMSC, respectivamente, y se determinó el área libre de células.

### **3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Los datos cuantitativos se analizaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilks (para evaluar la normalidad de las poblaciones), Chi-Cuadrado de Pearson (para evaluar su independencia), la prueba de Levene (para evaluar la homogeneidad de las varianzas) y la T-Student (para evaluar si las medias de dos poblaciones son diferentes). Se consideró significación estadística cuando  $p < 0,05$ .



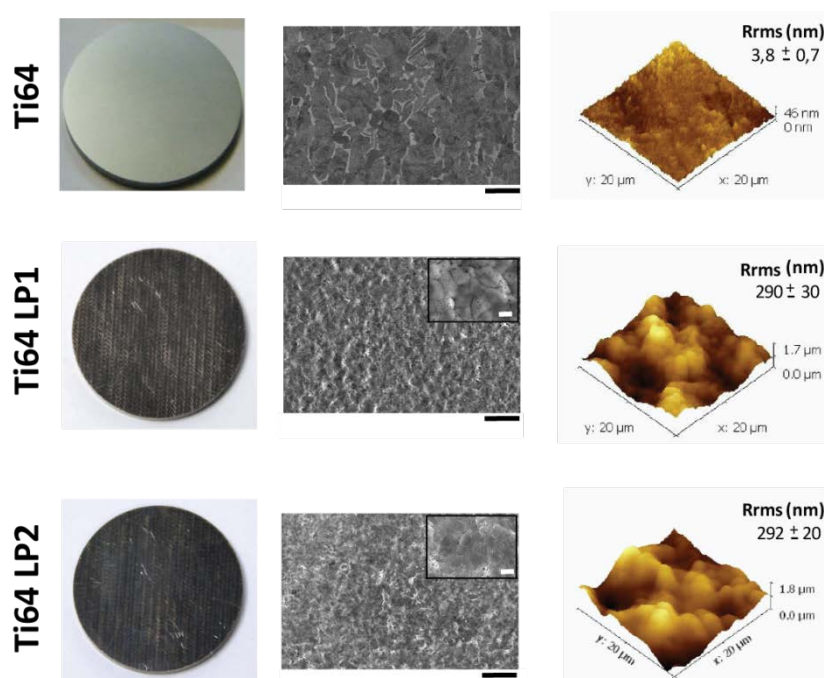
## ***RESULTADOS***



## 1. COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS SOBRE LA ALEACIÓN Ti64 MODIFICADA MEDIANTE LP

### 1.1. Caracterización superficial de los materiales

La comparación visual entre el material Ti64 y las muestras tratadas con 421 pulsos/cm<sup>2</sup> (Ti64 LP1) ó 2.524 pulsos/cm<sup>2</sup> (Ti64 LP2) de láser reveló diferencias en su aspecto superficial (Fig. 1, panel izquierdo). Las muestras Ti64 LP1 y LP2 presentaron una tonalidad azulada que sugiere la formación de una capa de óxido en la superficie. Además, se pueden apreciar en ambas muestras huellas consecuencia de la interacción del láser con el material. La morfología superficial de la aleación tras el tratamiento con láser se estudió mediante SEM (Fig. 1, panel central). Las imágenes del material Ti64 revelaron una superficie homogénea, con ausencia de irregularidades mientras que las muestras Ti64 LP1 y LP2 presentan una superficie ondulada con pequeños granos de entre 2 y 3 µm de tamaño. Estos cambios microestructurales podrían ser atribuibles al tratamiento con láser, que eleva la temperatura de la superficie de la aleación provocando su ablación y fundido. A partir de las imágenes obtenidas mediante AFM se determinó la rugosidad de las superficies (Fig. 1, panel derecho). Se observó que la rugosidad aumenta en las muestras tratadas en relación a las muestras Ti64, si bien no existen diferencias significativas entre Ti64 LP1 y Ti64 LP2.



**Figura 1. Aspecto superficial y topografía de Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2.** Izquierda, fotografías del aspecto superficial de las muestras. Centro, imágenes obtenidas mediante SEM de las superficies de las muestras, con magnificaciones de las mismas. Barra=200 µm. Barra en las magnificaciones=20 µm. Derecha, perfiles topográficos de las superficies de las muestras, obtenidos mediante AFM, y valores de rugosidad superficial (Rrms) asociada a un área de barrido de 20 x 20 µm.

La naturaleza de las fases cristalinas en la superficie de las diferentes muestras se determinó mediante DRX. Como se aprecia en la Tabla 2, en las tres muestras se detectó presencia mayoritaria de las fases  $\alpha$  y  $\beta$  de la aleación. El tratamiento con láser dio lugar a la aparición de un óxido de titanio metaestable (TiO), en mayor porcentaje en las muestras Ti64 LP2 que en Ti64 LP1. En las muestras Ti64 LP2 también se detectó un pequeño porcentaje de rutilo.

	Fase $\alpha$	Fase $\beta$	TiO	TiO <sub>2</sub>
Ti64	86	14	-	-
Ti64 LP1	65	22	13	-
Ti64 LP2	62	18	19	1

**Tabla 2. Fases cristalinas de Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2.** Porcentaje en masa de las fases cristalinas presentes en las muestras, determinado mediante DRX.

La composición de la capa más superficial de las muestras se analizó mediante XPS (Fig. 2). El espectro de alta resolución de la región Ti2p de la superficie no tratada muestra la presencia de un pico principal a 458,2 eV correspondiente a  $\text{Ti}^{4+}2p_{3/2}$  y su asociado correspondiente a  $\text{Ti}^{4+}2p_{1/2}$  situado a 5,7 eV. La deconvolución aplicada a este espectro para los niveles  $\text{Ti}^{3+}$  o  $\text{Ti}^0$ , correspondiente al titanio metálico, indica que estas contribuciones son muy pequeñas, lo que revela una presencia mayoritaria de  $\text{TiO}_2$  en su superficie (Fig. 2A). En el caso de las muestras tratadas puede observarse que los picos del espectro correspondientes a  $\text{Ti}^{4+}2p_{3/2}$  y su asociado  $\text{Ti}^{4+}2p_{1/2}$  pierden simetría de forma acusada respecto a los de la muestra sin tratar. En este caso, la deconvolución del espectro indica una contribución muy importante de  $\text{Ti}^{3+}2p_{3/2}$  y su asociado correspondiente a  $\text{Ti}^{3+}2p_{1/2}$  situado a 5,5 eV, lo que confirma una presencia importante de  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  además de  $\text{TiO}_2$  en la capa de pasivado. El análisis XPS también reveló la existencia de óxidos de aluminio en la superficie de las tres muestras, que el análisis DRX no había permitido detectar (Fig. 2B). Los espectros de alta resolución de la región Al2p indicaron que este elemento se encuentra mayoritariamente como  $\text{Al}_2\text{O}_3$  en la superficie de las tres muestras. Además, en las muestras tratadas se detectó la presencia de hidróxidos de aluminio Al-OH.

Los perfiles de profundidad para los iones  $\text{OH}^-$ ,  $\text{TiO}^-$ ,  $\text{TiO}_2^-$  y  $\text{AlO}^-$  se investigaron mediante análisis Tof-Sims. Los resultados indicaron que el espesor de la capa de pasivado en las muestras tratadas con láser es considerablemente mayor que en Ti64, siendo más gruesa en Ti64 LP2 que en Ti64 LP1 (Fig. 3).



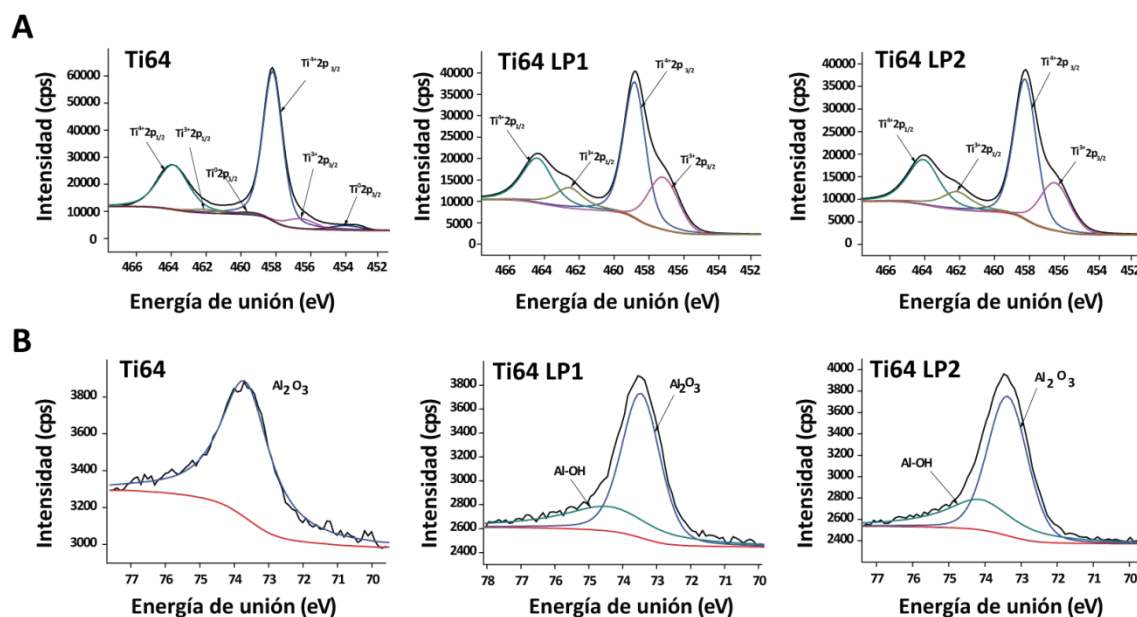


Figura 2. Composición química de la capa superficial y subsuperficial de Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2. Espectros de alta resolución de la región Ti2p (A) y de la región Al2p (B), obtenidos mediante XPS.

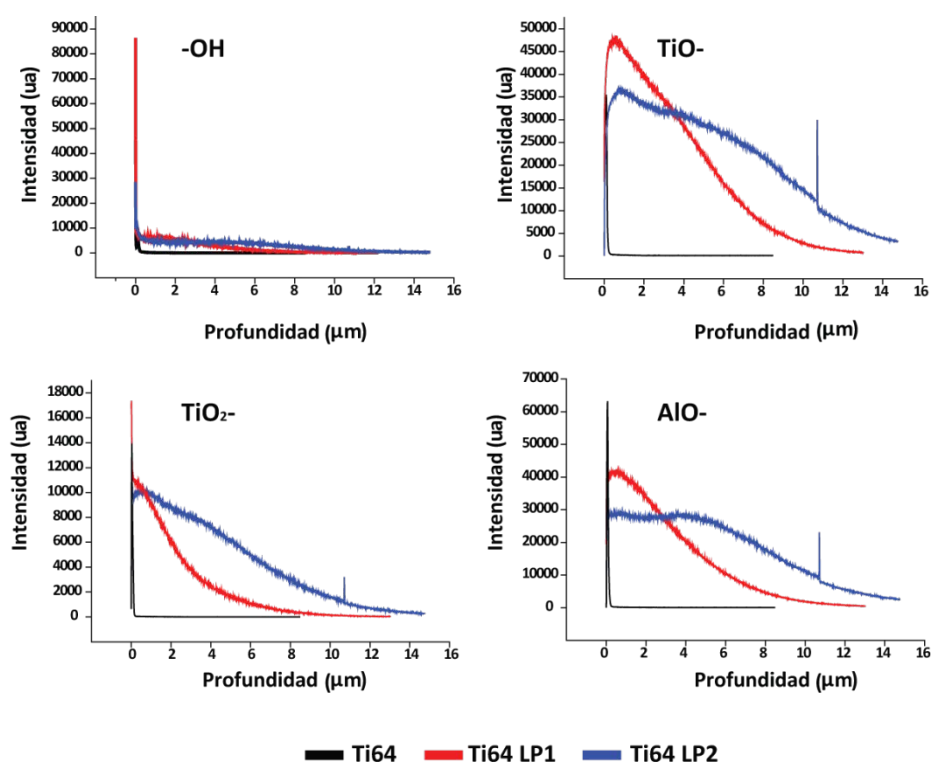
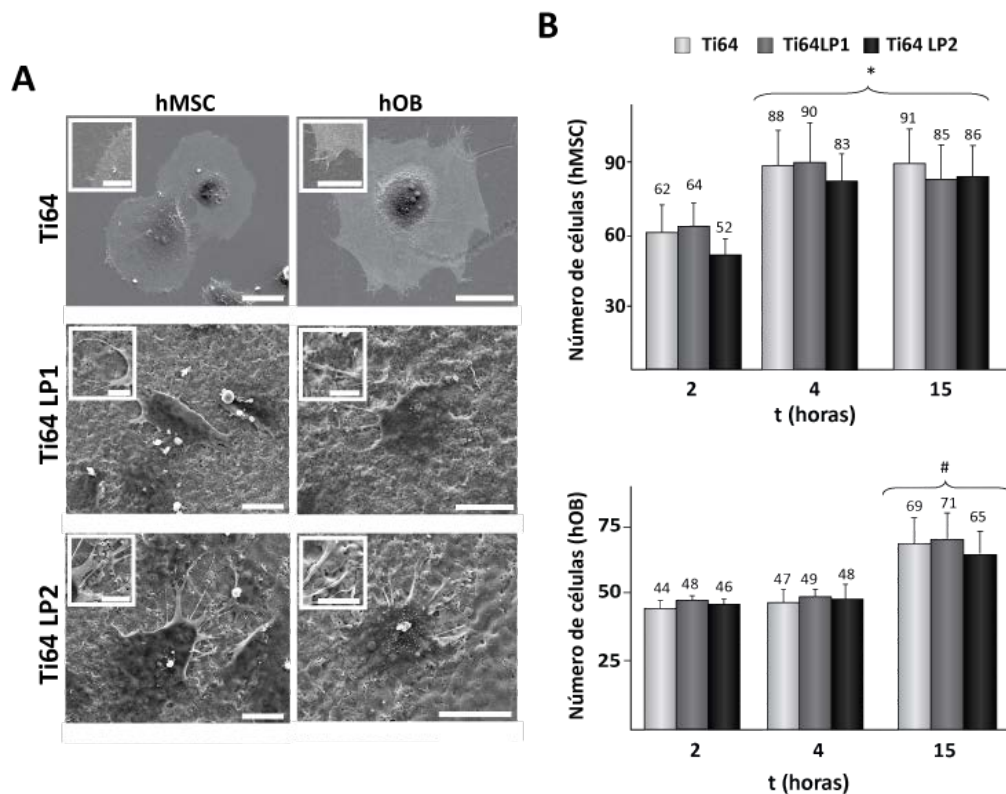


Figura 3. Composición en profundidad de la superficie de Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2. Perfiles de profundidad para los iones OH-, TiO-, TiO₂- y AlO-, obtenidos mediante ToF-Sims.

### 1.2. Morfología, adhesión y área celular sobre Ti64 modificada mediante LP

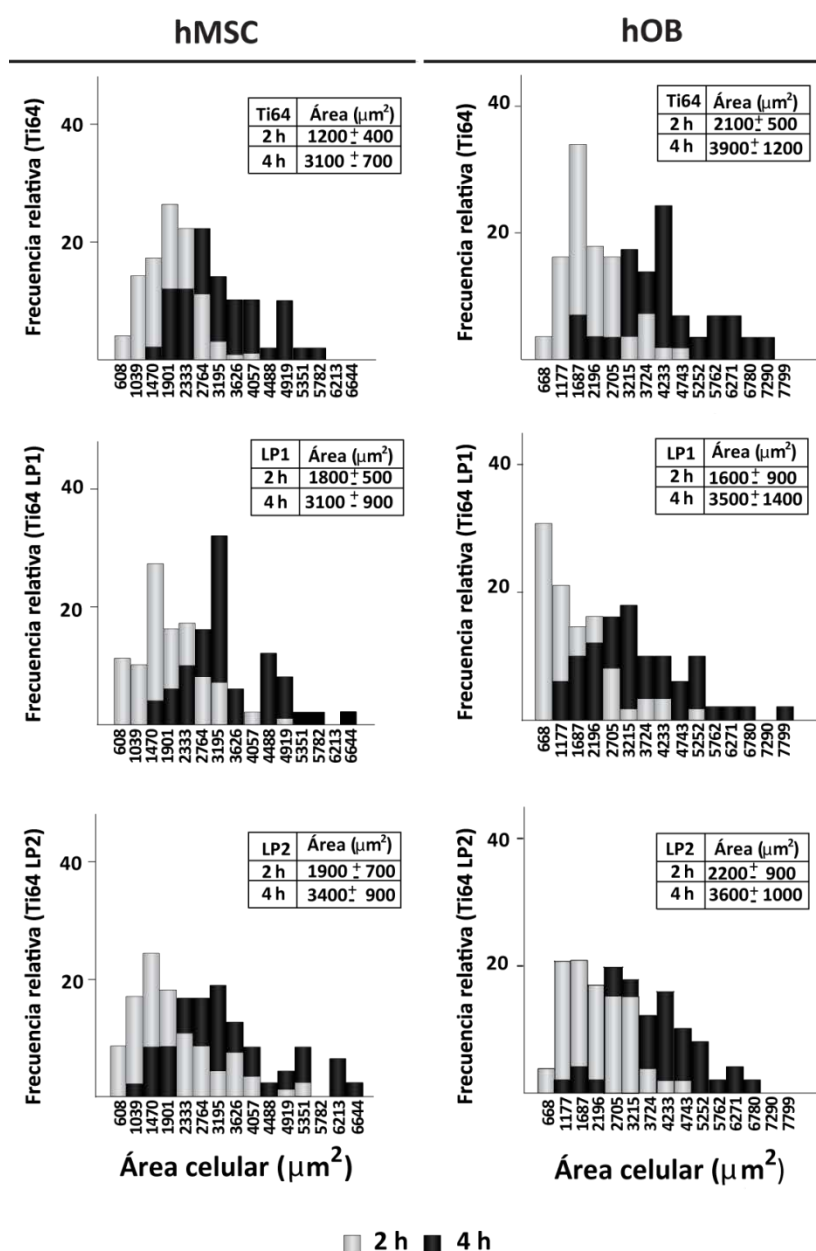
La morfología de hMSC y hOB cultivados durante 4 h en los materiales Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2 se examinó mediante SEM. Sobre la aleación sin tratar se observaron células bien adheridas, redondeadas y expandidas, que presentaban filopodios de pequeño tamaño alrededor de toda la superficie celular (Fig. 4A). Sobre las muestras tratadas, las células adquirieron una morfología más alargada, con apariencia irregular. Además, tanto hMSC como hOB mostraron numerosos lamelipodios de gran tamaño con filopodios en sus extremos. A continuación, se cuantificó el número de células adheridas a los materiales tras 2, 4 y 15 h de cultivo (Fig. 4B).



**Figura 4. Morfología y adhesión de hMSC y hOB cultivados en Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2.** (A) Imágenes obtenidas mediante SEM de hMSC y hOB cultivados 4 h sobre los materiales. Se muestran magnificaciones de las prolongaciones celulares en el interior de las imágenes. Barra=25  $\mu$ m. Barra de magnificaciones=10  $\mu$ m. (B) Número de células adheridas a los materiales tras 2, 4 y 15 h de cultivo. Los resultados se expresan como el número de células adheridas en un área de 727 x 727  $\mu$ m. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p$ <0,05 respecto a la misma condición experimental a 2 h. # $p$ <0,05 respecto a la misma condición experimental a 2 y 4 h.

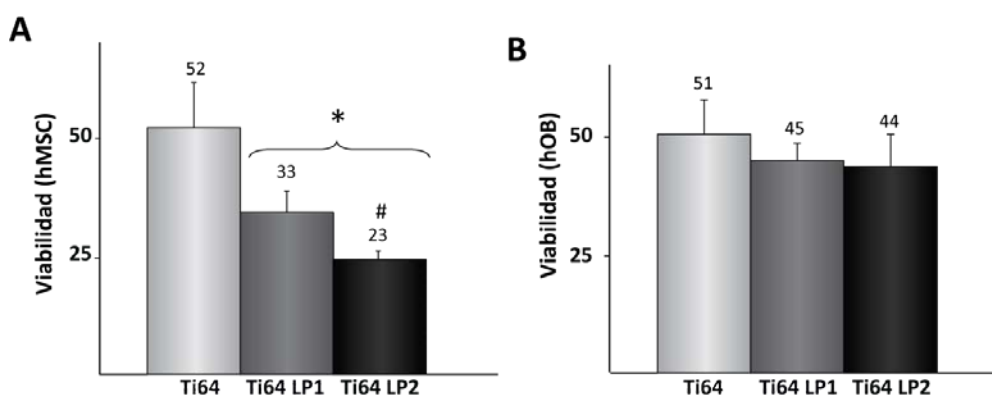
Se observó que el número de hMSC y hOB adheridos a los tres materiales incrementó con el tiempo de incubación. En función del tipo celular examinado, detectamos ciertas diferencias en cuando a la cinética de adhesión a la aleación Ti64, siendo más rápida la de las hMSC que la de los hOB. Así, el número de hMSC adheridas aumentó entre las 2 y 4 h de cultivo, manteniéndose inalterado durante el resto del periodo de observación. Sin embargo,

el número de hOB adheridos se mantuvo constante entre las 2 y 4 h, incrementando posteriormente. El tratamiento con láser no alteró el número de células que se adhieren a la aleación. El área de hMSC y hOB cultivados sobre Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2 durante 2 y 4 h aumentó con el tiempo de incubación. No se detectaron diferencias significativas entre las áreas de células cultivadas sobre las aleaciones tratadas o sin tratar, observándose en los tres materiales ensayados una gran heterogeneidad del tamaño celular (Fig. 5).



**Figura 5.** Área de hMSC y hOB cultivados en Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2. Histogramas de frecuencia relativa que muestran la distribución del área celular de hMSC y hOB cultivados durante 2 y 4 h sobre los materiales. En las cajas se muestra la media  $\pm$  DE del área celular cuantificada en tres experimentos independientes.

Quisimos estudiar la contribución de moléculas dependientes de calcio en el proceso de adhesión de células cultivadas sobre las aleaciones tratadas o sin tratar. Para ello, las células se cultivaron 15 h en los materiales y se incubaron durante 20 min con una solución de PBS que contiene EDTA, cuantificándose a continuación la actividad metabólica de las células que permanecen adheridas empleando el reactivo alamarBlue. De acuerdo a los datos obtenidos, aproximadamente el 50 % de hMSC y hOB permanecieron adheridos a la superficie Ti64 tras la incubación con el agente quelante de calcio (Fig. 6). El porcentaje de hMSC adheridas fue significativamente inferior en las superficies tratadas térmicamente, siendo esta disminución más acusada en el caso de las superficies Ti64 LP2. Estos datos indican que en células hMSC las interacciones mediadas por moléculas de adhesión dependientes de calcio tienen una mayor contribución en la adhesión a las superficies tratadas que a las superficies sin tratar. Este fenómeno no se observó en el caso de hOB, en los que no se detectaron diferencias significativas entre los tres materiales investigados.



**Figura 6. Adhesión dependiente de moléculas de calcio en hMSC y hOB cultivadas en Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2.** Las células hMSC (A) y hOB (B) se cultivaron durante 15 h en los materiales, tras lo cual se incubaron durante 20 min con una solución de PBS que contiene EDTA 0,5 mM. La viabilidad celular se cuantificó inmediatamente antes de añadir la solución y tras la incubación. En cada tipo celular, los datos se presentan como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la cuantificada inmediatamente antes de añadir la solución, a la que se otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a células cultivadas en Ti64; # $p < 0,05$  respecto a células cultivadas en Ti64 LP1.

Las adhesiones focales y la reorganización del citoesqueleto de actina se estudiaron mediante microscopía confocal en hOB y hMSC cultivados sobre los materiales durante 4, 15 y 24 h (Fig. 7-8). Tras incubar ambos tipos celulares durante 4 h sobre la aleación sin tratar pudimos observar una disposición concéntrica de las fibras de estrés alrededor de la zona nuclear. Sin embargo, tanto en hMSC como en hOB cultivados sobre los materiales tratados se detectó la formación de numerosas protrusiones citoplasmáticas que contenían actina y se orientaban en todas las direcciones. Al aumentar la incubación a 15 h, las células adquirieron

formas poligonales sobre los tres tipos de materiales, organizándose el citoesqueleto de actina en fibras de estrés bien definidas, distribuidas paralelamente entre sí y en su mayoría orientadas a lo largo del eje longitudinal de la célula. Las protrusiones citoplasmáticas se continuaron observando en células cultivadas sobre Ti64 LP1 y LP2 tras 24 h de incubación. Las adhesiones focales se investigaron mediante ensayos de colocalización de actina y paxilina, p-FAK Y397 o p-FAK Y407 (Fig. 7-12). Tras tan sólo 4 h de cultivo en muestras Ti64, se detectó tinción positiva para paxilina en la periferia de hMSC y hOB, colocalizando con los extremos de las fibras de actina. En células cultivadas sobre muestras Ti64 LP1 y Ti64 LP2, paxilina se dispuso en las protrusiones citoplasmáticas pero, a excepción de algunas adhesiones focales aisladas, no fue posible detectar colocalización con actina ni en hMSC ni en hOB a ninguno de los tiempos de cultivo estudiados. Además, se observó que la longitud de la señal de paxilina en la periferia celular era notablemente menor en hMSC y hOB cultivados sobre Ti64 LP1 y Ti64 LP2 que en células cultivadas sobre superficies no tratadas (Fig. 9A-B). No se detectaron diferencias entre la longitud de la señal de paxilina en células cultivadas sobre Ti64 LP1 y Ti64 LP2. Al igual que se observó con paxilina, p-FAK Y397 se dispuso en la periferia celular colocalizando con el extremo de las fibras de actina en células cultivadas en Ti64. Sin embargo, tanto en hMSC (Fig. 10A) como en hOB (Fig. 11A) cultivados en materiales tratados, la colocalización de p-FAK Y397 con las fibras de actina fue muy minoritaria. En relación a p-FAK Y407, se observó que colocalizaba con los extremos de las fibras de actina tanto en células cultivadas en Ti64 como en Ti64 LP1 y Ti64 LP2 (Fig. 10B-11B). A continuación se cuantificaron los niveles de p-FAK Y397 en extractos de hMSC y hOB cultivados durante 15 h en los materiales. En relación con células cultivadas sobre materiales no tratados, los niveles de FAK fosforilada en el residuo 397 se redujeron notablemente en células adheridas a las aleaciones tratadas (Fig. 12). No se detectaron diferencias entre los niveles detectados en células cultivadas sobre Ti64 LP1 o Ti64 LP2. En conjunto, estos resultados informan de una profunda alteración en la formación de adhesiones focales en hMSC y hOB que interaccionan con las aleaciones tratadas mediante LP.

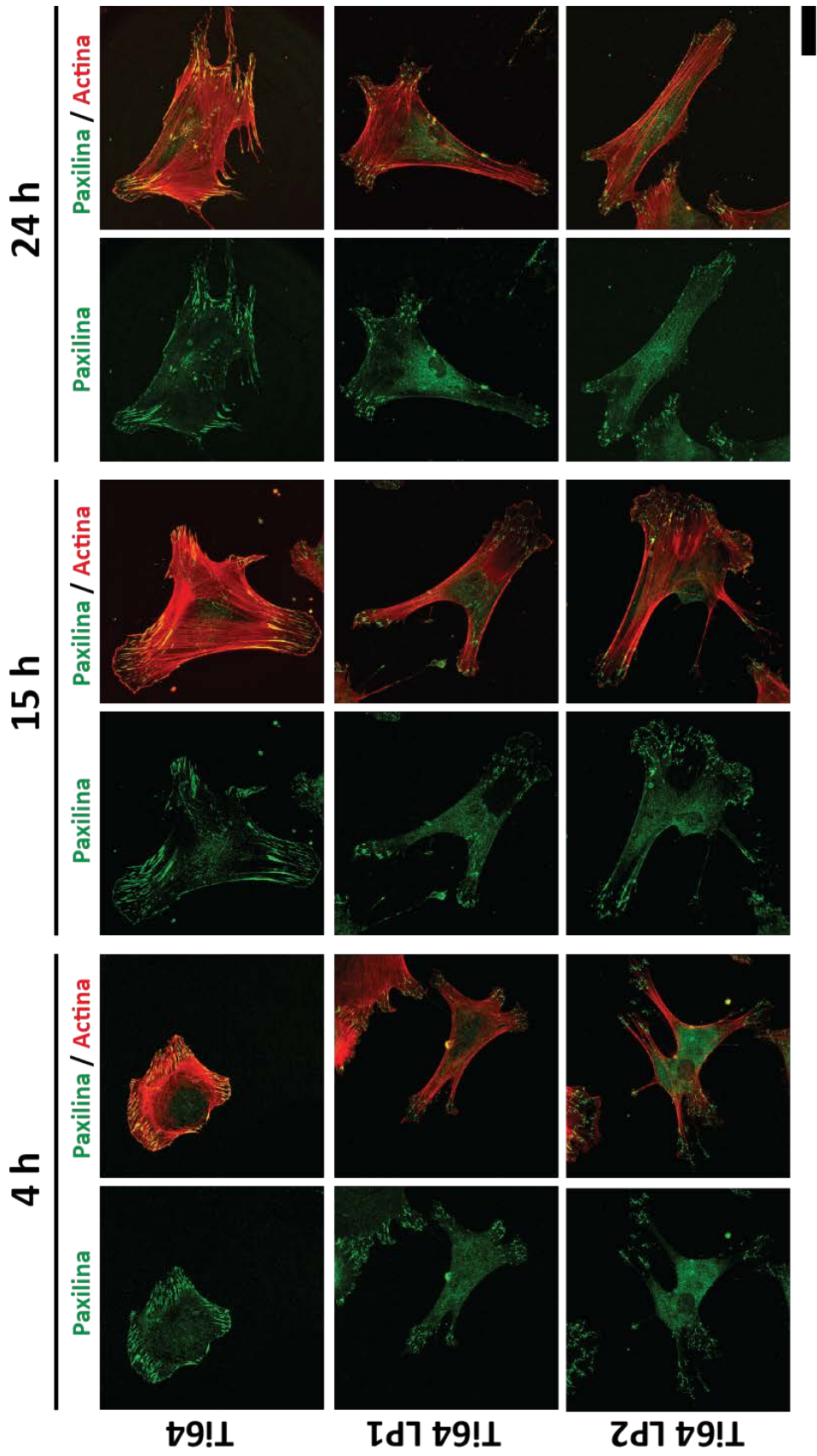
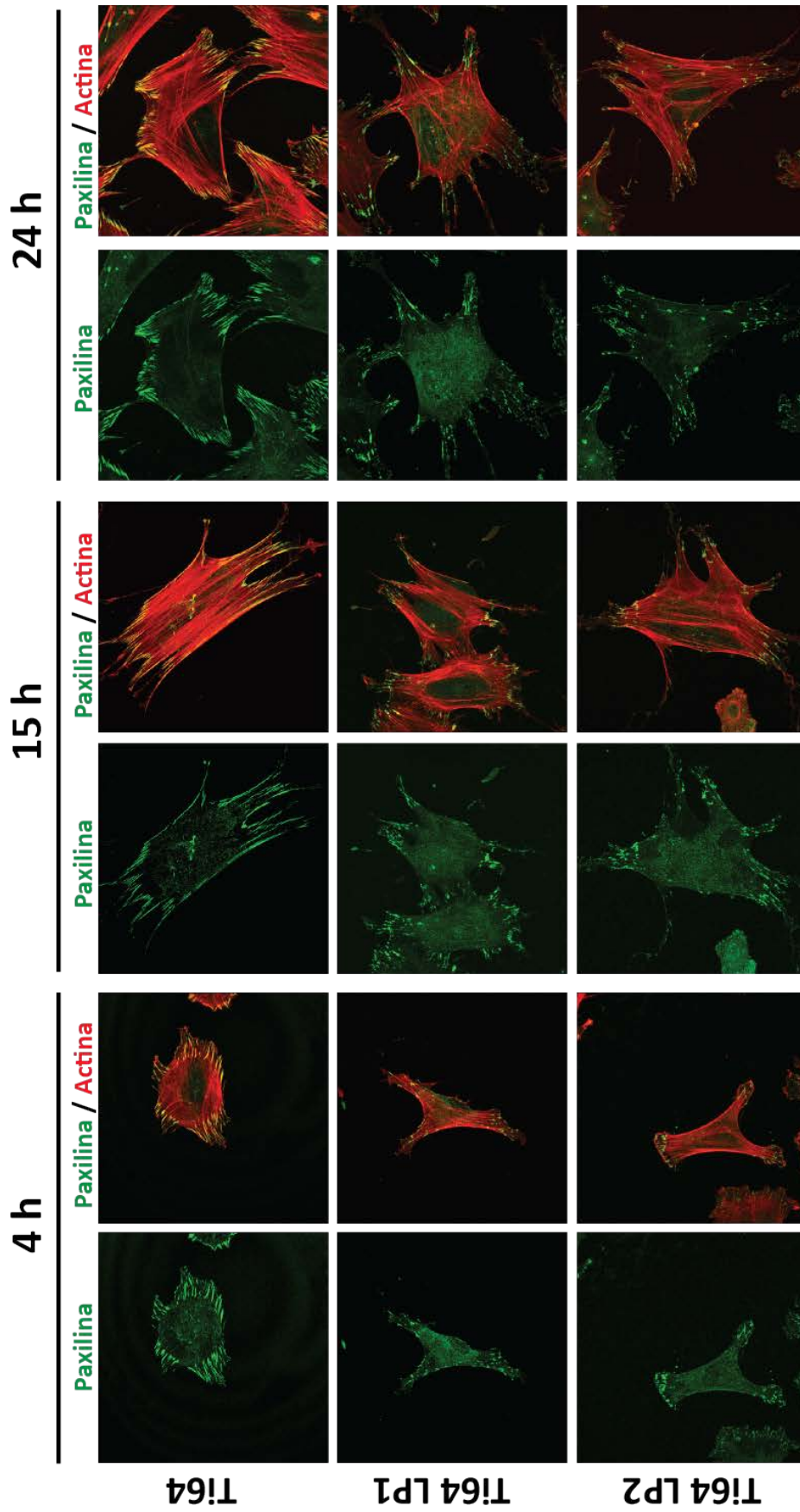
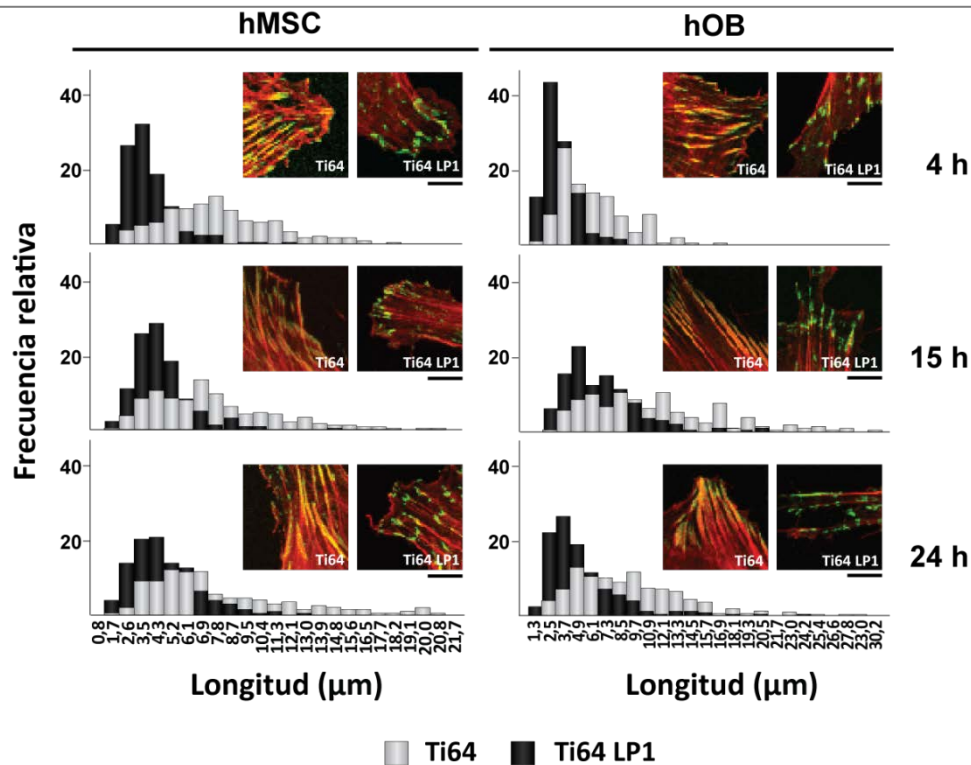


Figura 7. Distribución del citoesqueleto de actina y paxilina en hMSC cultivadas en Ti64, Ti64 LP1 y LP2. Tinción de paxilina (verde) y actina (rojo) en hMSC cultivadas durante 4, 15 y 24 h en los materiales. Imágenes, obtenidas mediante microscopía confocal, representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. Barra=40  $\mu$ m

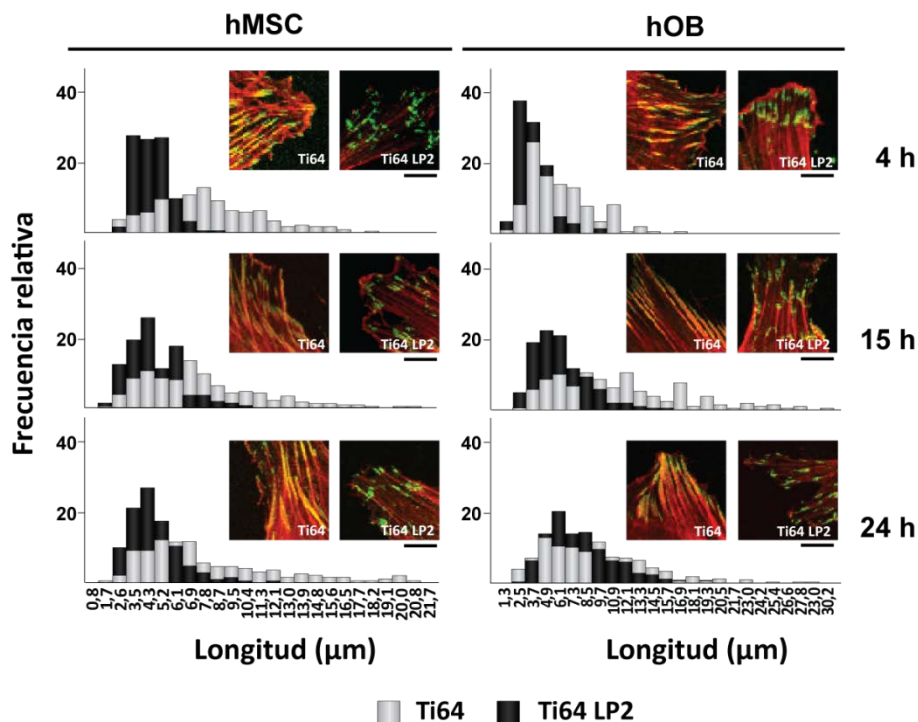




**Figura 8.** Distribución del citoesqueleto de actina y paxilina en hOB cultivados en Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2. Tinción de paxilina (verde) y actina (rojo) en hOB cultivados durante 4, 15 y 24 h en los materiales. Imágenes, obtenidas mediante microscopía confocal, representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. Barra=40  $\mu$ m

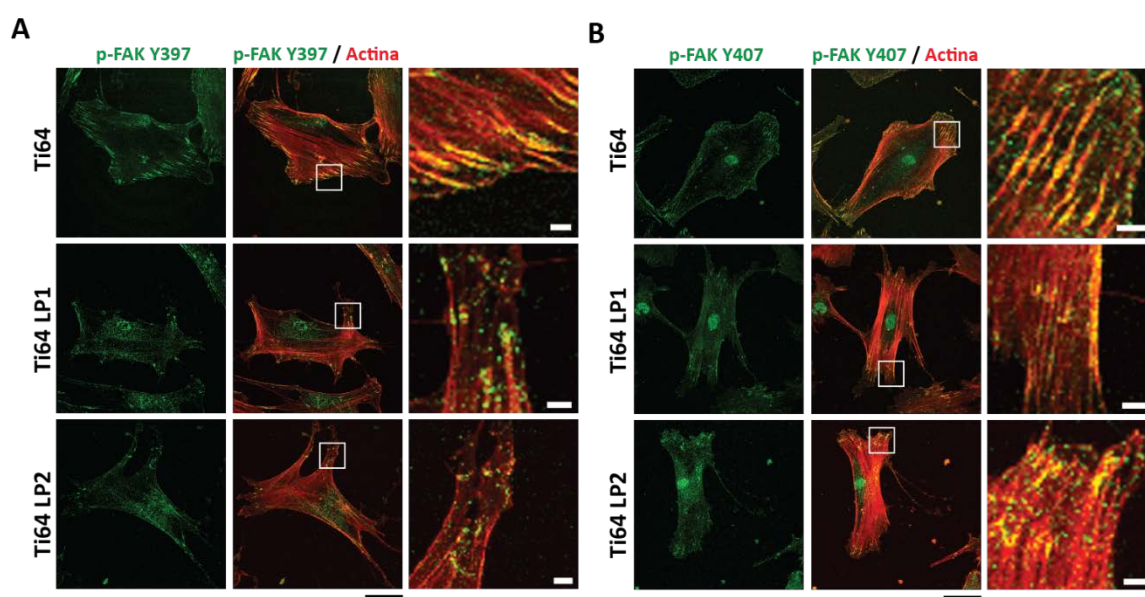


**Figura 9A.** Longitud de la señal de fluorescencia correspondiente a paxilina en las adhesiones focales de células cultivadas en Ti64 y Ti64 LP1. Histogramas de frecuencia relativa que muestran la distribución de la longitud de la señal de fluorescencia de paxilina en hMSC y hOB cultivados durante 4, 15 y 24 h en los materiales. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal con detalles de adhesiones focales. Barra=10 μm.

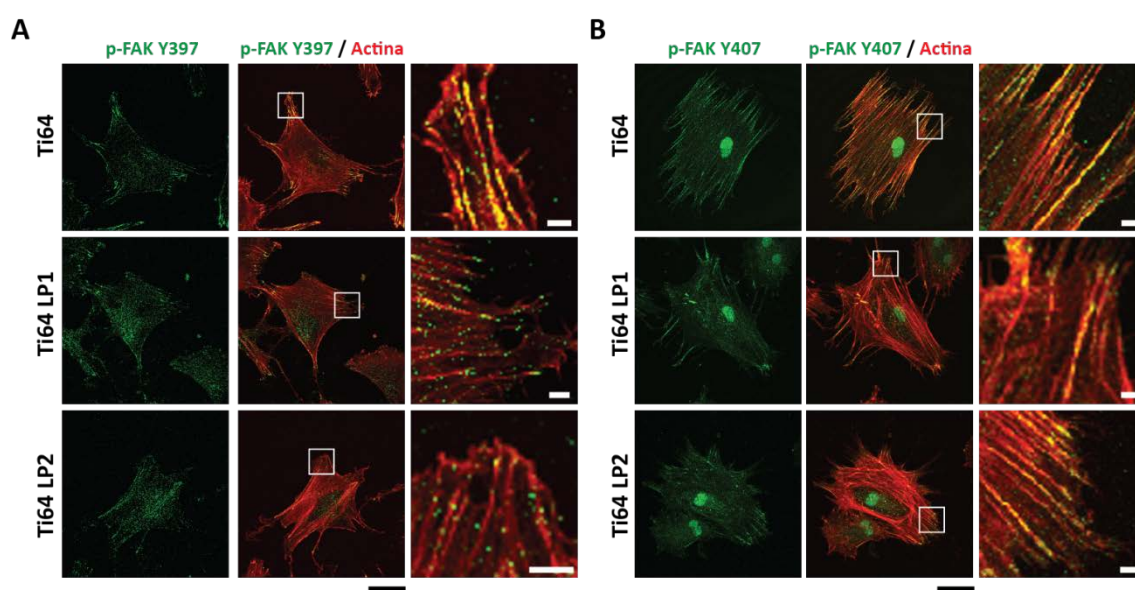


**Figura 9B.** Longitud de la señal de fluorescencia correspondiente a paxilina en las adhesiones focales de células cultivadas en Ti64 y Ti64 LP2. Histogramas de frecuencia relativa que muestran la distribución de la longitud de la señal de fluorescencia de paxilina en hMSC y hOB cultivados durante 4, 15 y 24 h en los materiales. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal con detalles de adhesiones focales. Barra=10 μm.

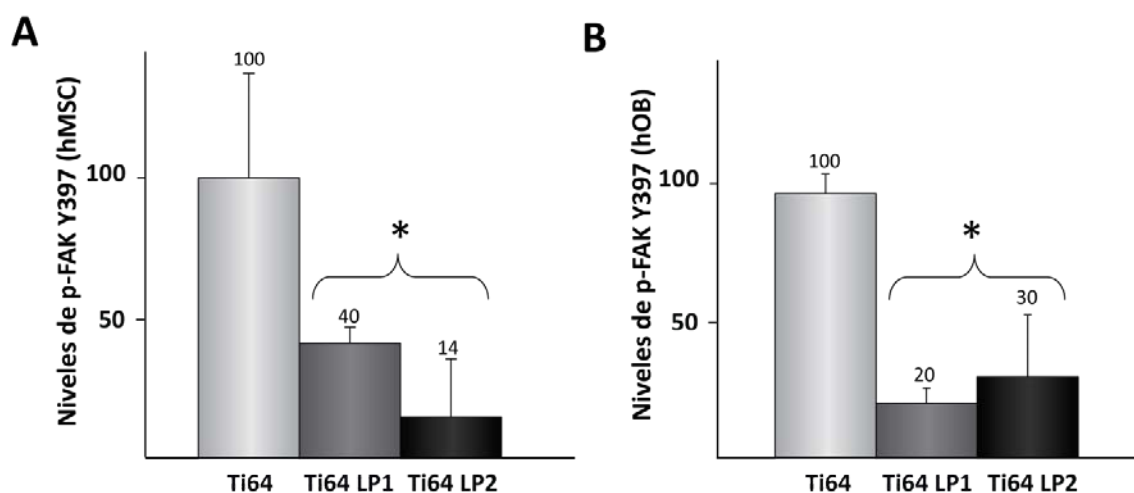




**Figura 10.** Distribución del citoesqueleto de actina y p-FAK Y397 o p-FAK Y407 en hMSC cultivados en Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2. Tinción de (A) p-FAK Y397 o (B) p-FAK Y407 (verde) y actina (rojo) en hMSC cultivadas durante 15 h en los materiales. Imágenes, obtenidas mediante microscopía confocal, representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. Barra=40  $\mu$ m. Se muestran magnificaciones de las imágenes. Barra en las imágenes magnificadas=4  $\mu$ m.



**Figura 11.** Distribución del citoesqueleto de actina y p-FAK Y397 o p-FAK Y407 en hOB cultivados en Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2. Tinción de (A) p-FAK Y397 o (B) p-FAK Y407 (verde) y actina (rojo) en hOB cultivados durante 15 h en los materiales. Imágenes, obtenidas mediante microscopía confocal, representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. Barra=40  $\mu$ m. Se muestran magnificaciones de las imágenes. Barra en las imágenes magnificadas=4  $\mu$ m.

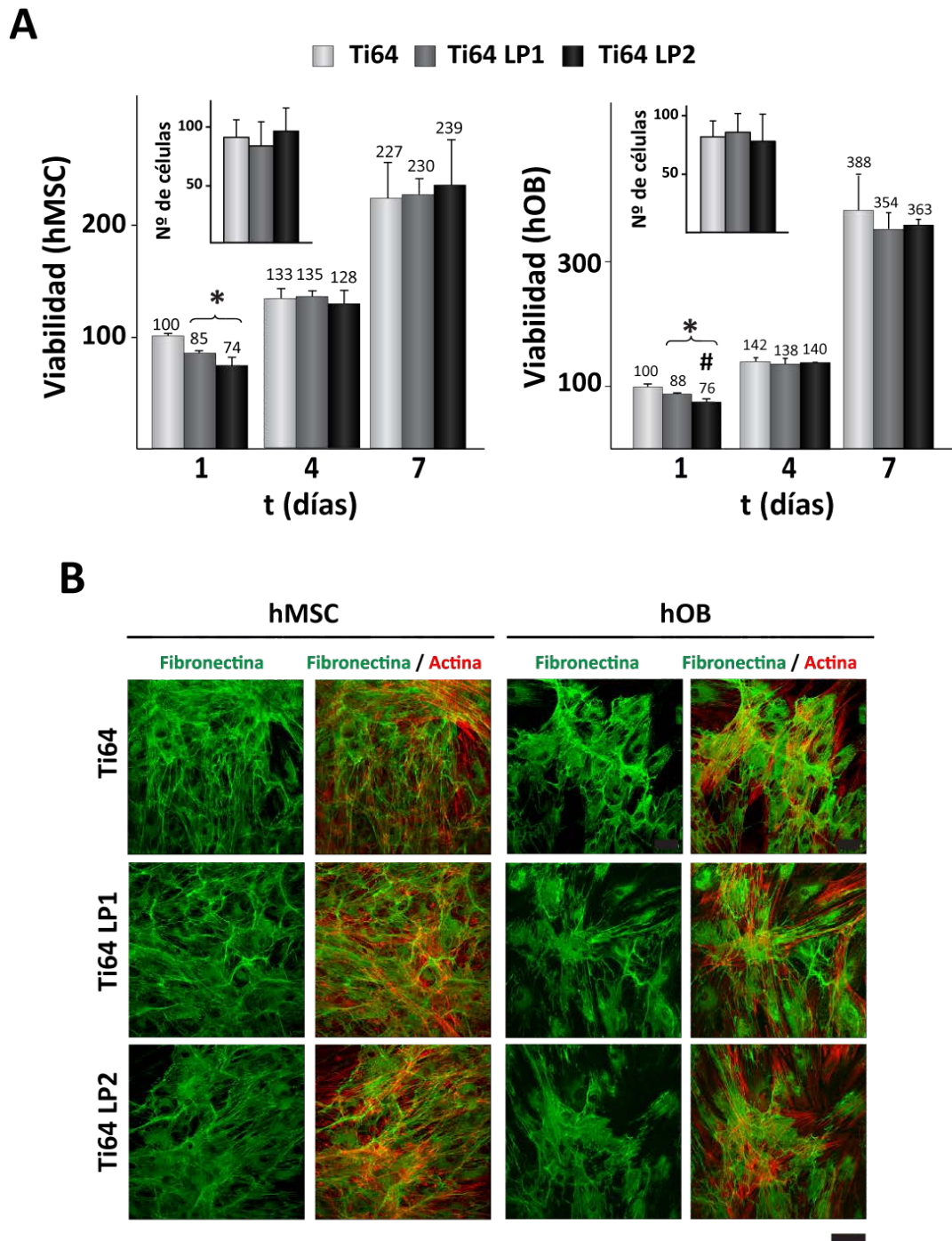


**Figura 12. Niveles de p-FAK Y397 en hMSC y hOB cultivados en Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2.** Niveles relativos de p-FAK Y397 en células cultivadas durante 15 h en los materiales. Los resultados se expresan como el porcentaje de p-FAK Y397 en células cultivadas sobre Ti64. Estos valores fueron de  $2,56 \pm 0,95$  y de  $0,19 \pm 0,01$  U/ml por  $\mu\text{g}$  de proteína en el caso de hMSC y hOB, respectivamente, y se les otorgó un valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a células cultivadas en Ti64.

### 1.3. Viabilidad celular y formación de matriz extracelular sobre Ti64 modificada mediante LP

A continuación se estudió la viabilidad de hMSC y hOB cultivados durante 1, 4 y 7 días en muestras de Ti64 tratadas o no mediante LP. Al cabo de 1 día de cultivo se observó una disminución de la actividad metabólica en células cultivadas sobre las aleaciones tratadas (Fig. 13A). Mientras que no se observaron diferencias significativas entre hMSC cultivadas sobre Ti64 LP1 o Ti64 LP2, la actividad metabólica de los hOB fue menor en los materiales Ti64 LP2 que en Ti64 LP1. Esta disminución en la viabilidad de hMSC y hOB no es atribuible a un menor número de células adheridas a los materiales tratados, que en ambos tipos celulares fueron similares a los cuantificados sobre la aleación sin tratar (Fig. 13A). Tanto la actividad metabólica de hOB como de hMSC aumentó a medida que se incrementaba el tiempo de cultivo. Tras 4 ó 7 días de cultivo no se observaron diferencias en la viabilidad de hMSC u hOB cultivados sobre los materiales tratados o sin tratar.

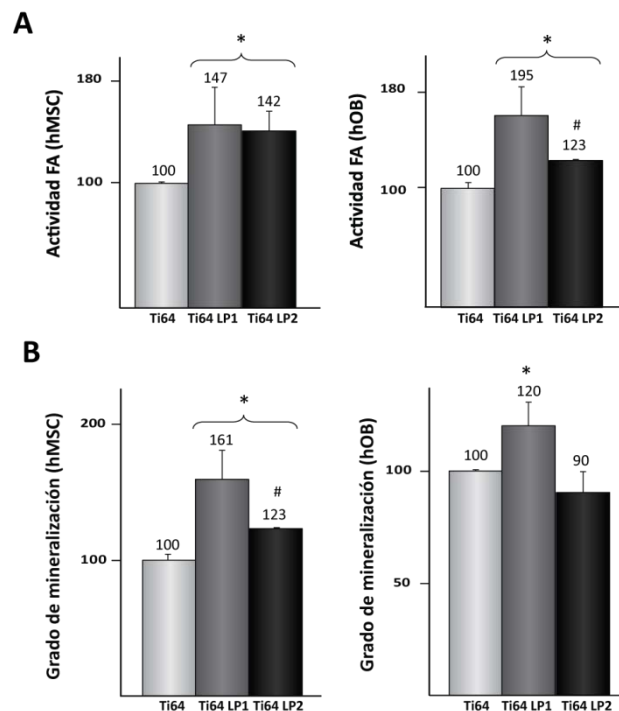
La formación de matriz extracelular sobre los materiales se investigó en hMSC u hOB cultivados durante 7 días en los materiales, mediante ensayos de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo específico para FN humana (Fig. 13B). Tanto sobre la aleación sin tratar como sobre las tratadas, ambos tipos celulares ensamblaron una matriz densa de fibras de FN a lo largo de la superficie celular y del material que conecta las células entre sí.



**Figura 13. Viabilidad y formación de matriz extracelular en hMSC y hOB cultivados en Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2.** (A) Viabilidad celular al cabo de 1, 4 y 7 días de cultivo sobre los materiales. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente a células cultivadas en Ti64 durante 1 día. A estos datos se les otorgó el valor arbitrario de 100. En el interior de los gráficos se muestra el número de células adheridas a los materiales tras 1 día de cultivo. Los resultados se expresan como el número de células adheridas en una superficie de 727 x 727  $\mu\text{m}$ . Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a Ti64. # $p < 0,05$  respecto a Ti64 LP1. (B) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células cultivadas durante 7 días sobre los materiales. Se muestran imágenes correspondientes a la tinción de fibronectina (verde) y actina (rojo). Barra=25  $\mu\text{m}$ .

#### 1.4. Actividad FA y grado de mineralización sobre Ti64 modificada mediante LP

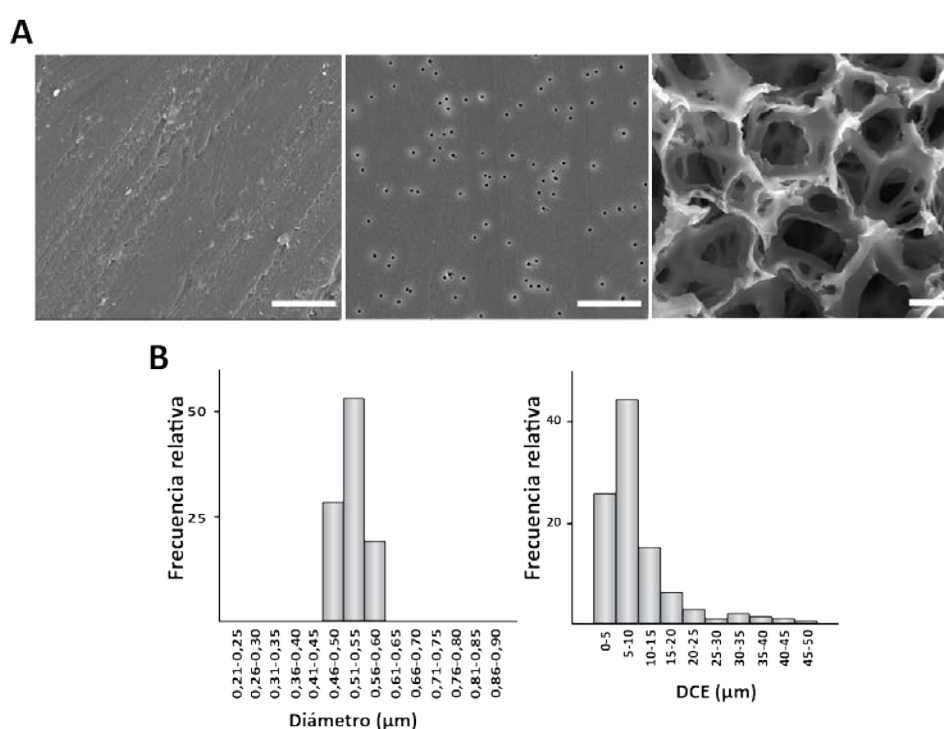
La capacidad de las células para expresar marcadores de fenotipo osteoblástico se investigó tras su cultivo en medio osteogénico sobre los materiales. En ambos tipos celulares, la actividad FA fue superior tras ser cultivados sobre Ti64 LP1 y Ti64 LP2 que sobre la aleación sin tratar (Fig. 14A). En hMSC, la actividad FA fue similar en ambas aleaciones tratadas mientras que en hOB la actividad enzimática de células cultivadas en Ti64 LP1 fue mayor que en las sembradas en Ti64 LP2. También se estudió la capacidad de mineralización de las células cultivadas sobre los materiales (Fig. 14B), que fue superior en cultivos de hMSC sembradas sobre las aleaciones tratadas que sobre Ti64. Se observó un mayor grado de mineralización de la capa celular en cultivos de hMSC sembradas sobre Ti64 LP1 que sobre Ti64 LP2. En el caso de los hOB, la formación de nódulos de mineralización se vio incrementada tras su cultivo en Ti64 LP1, no observándose diferencias entre la aleación Ti64 o Ti64 LP2.



**Figura 14. Actividad FA y grado de mineralización en hMSC y hOB cultivados en Ti64, Ti64 LP1 y Ti64 LP2.** Las células se cultivaron durante 13 días sobre los materiales en medio osteogénico y se cuantificó (A) la actividad FA y (B) el grado de mineralización de la capa celular. (A) Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad enzimática de células cultivadas sobre Ti64. Estos valores fueron de  $15,2 \pm 0,2$  y de  $95,3 \pm 4,6$  nmoles p-nitrofenol/mg proteína/min en el caso de hMSC y hOB, respectivamente, y se les otorgó un valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. (B) Los resultados se expresan como el porcentaje de la absorbancia de hMSC u hOB cultivados sobre Ti64, a los que se les otorgó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a células cultivadas en Ti64; # $p < 0,05$  respecto a células cultivadas en Ti64 LP1.

## 2. CARACTERIZACIÓN DE SOPORTES LISOS Y POROSOS

La superficie de los diferentes soportes se caracterizó mediante SEM y perfilometría. Las imágenes de microscopía mostraron una superficie lisa en el caso del plástico de cultivos y del inserto (soporte liso). Se observó que el inserto presenta en su superficie numerosos poros de tamaño submicrométrico con dimensiones y forma muy homogéneos, mientras que el sustrato de poliestireno (soporte poroso) posee una estructura compuesta de poros micrométricos, irregulares y con diámetros muy diferentes (Fig. 15A). Tanto la superficie del plástico de cultivos como la del soporte liso presentaron niveles de rugosidad muy bajos, con valores de Ra de 7,2 y 4,7 nm, respectivamente. La distribución del tamaño de los poros de los soportes liso y poroso se determinó a partir de las imágenes de microscopía. Los histogramas muestran la homogeneidad del diámetro de los poros del soporte liso, centrado en 0,5  $\mu\text{m}$  (Fig. 15B, izquierda). En el caso del soporte poroso, se confirmó la heterogeneidad en el tamaño de sus poros, que en su mayoría presentaron un diámetro comprendido entre 2,9 y 15  $\mu\text{m}$  (Fig. 15B, derecha).

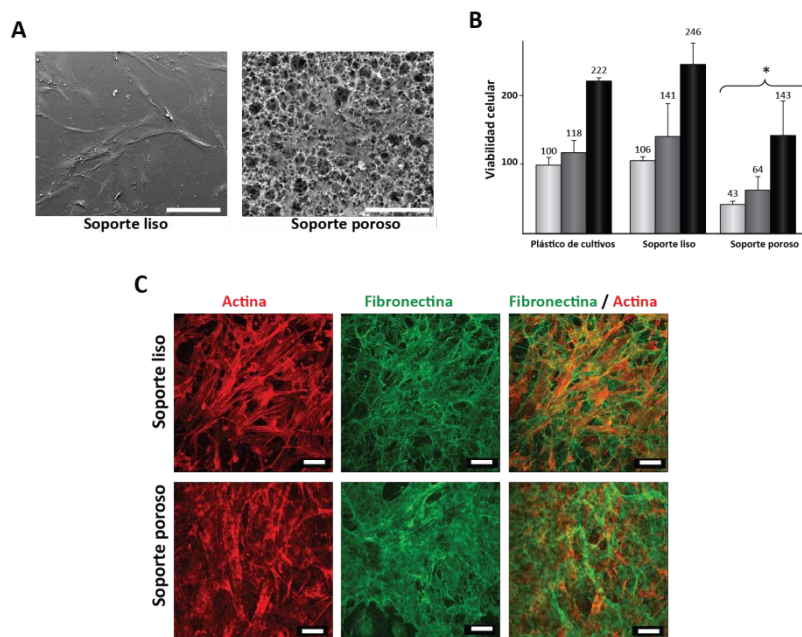


**Figura 15. Caracterización de la superficie de soportes lisos y porosos.** (A) Imágenes obtenidas mediante SEM del plástico de cultivos (izquierda), sustrato liso (centro) y poroso (derecha). Barra= 10  $\mu\text{m}$  (B) Frecuencia relativa del diámetro de poros en los soportes lisos (izquierda) y del diámetro del círculo equivalente (DCE) en los soportes porosos (derecha).



### 3. VIABILIDAD, MORFOLOGÍA CELULAR Y PRODUCCIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES CULTIVADAS SOBRE SOPORTES LISOS Y POROSOS

En primer lugar, se investigó la morfología de hMSC cultivadas durante 4 días en soportes lisos o porosos, a las cuales denominaremos hMSC<sup>S</sup>. Las imágenes mostraron células bien adheridas y expandidas sobre ambos soportes (Fig. 16A). A continuación, determinamos la viabilidad, arquitectura celular y producción de matriz extracelular en hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre los soportes. La viabilidad celular, determinada al cabo de 1, 7 y 14 días de incubación empleando el reactivo alamarBlue, fue similar en el soporte liso y en el plástico de cultivo. Las determinaciones de actividad metabólica sugieren que las células se adhieren inicialmente en menor medida al soporte poroso que al soporte liso o al plástico de cultivos (Fig. 16B). Sin embargo, la viabilidad celular sobre el soporte poroso incrementa de forma acusada con el tiempo de cultivo ( $p<0,05$ ). La formación de matriz extracelular sobre los soportes liso y poroso se investigó mediante ensayos de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo específico para FN humana (Fig. 16C). Tras 14 días de incubación sobre los soportes liso y poroso, las células ensamblan una matriz densa de fibras de FN sobre la superficie celular, que conecta las células en ambos soportes.



**Figura 16. Morfología, viabilidad y producción de matriz extracelular de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos y porosos.** (A) Imágenes obtenidas mediante SEM de hMSC<sup>S</sup> cultivadas durante 4 días en soportes lisos (izquierda) o porosos (derecha). Barra=200  $\mu$ m (B) Viabilidad de células cultivadas durante 1, 7 y 14 días en plástico de cultivos, soporte liso o soporte poroso. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 1 de incubación en plástico de cultivos, al que se le otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de seis experimentos independientes. \* $p<0,05$  respecto a células cultivadas sobre plástico de cultivos o soporte liso para la misma condición experimental. (C) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de hMSC<sup>S</sup> cultivadas durante 14 días sobre los soportes lisos y porosos. Se muestran imágenes correspondientes a la tinción de actina, fibronectina y la superposición de las imágenes de actina y fibronectina. Barra=50  $\mu$ m.

#### **4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE hMSC<sup>S</sup> CULTIVADAS EN SOPORTES POROSOS SOBRE OSTEOLASTOS**

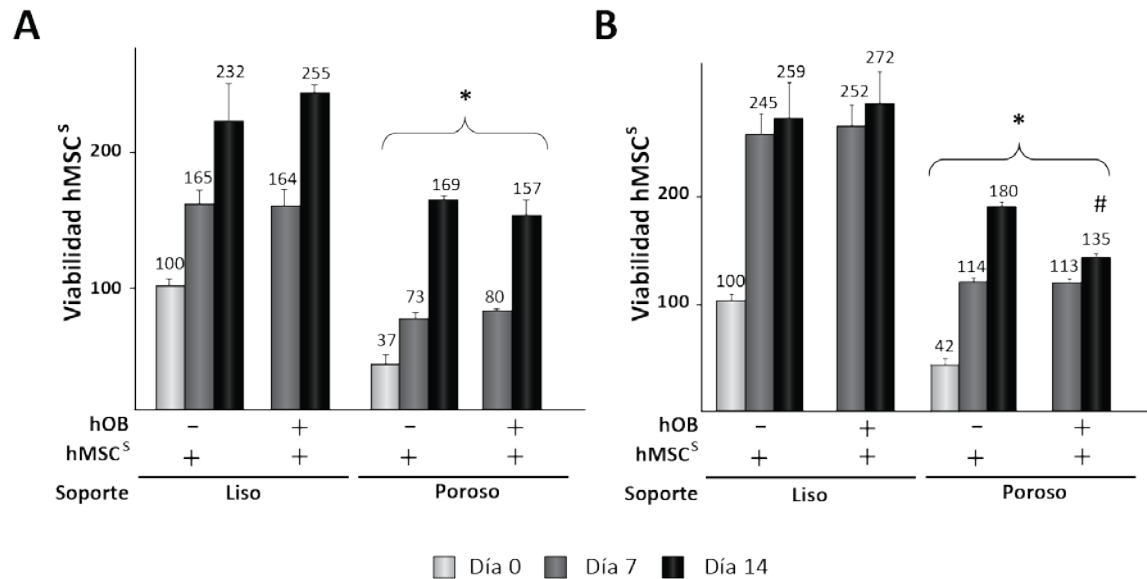
Nos propusimos determinar si la topografía del sustrato en el que se cultivan las hMSC<sup>S</sup> modula la actividad paracrina que estas células ejercen sobre los hOB. Para ello, cocultivamos hOB con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos o porosos, en ausencia de contacto directo.

##### **4.1. Efecto sobre la viabilidad celular**

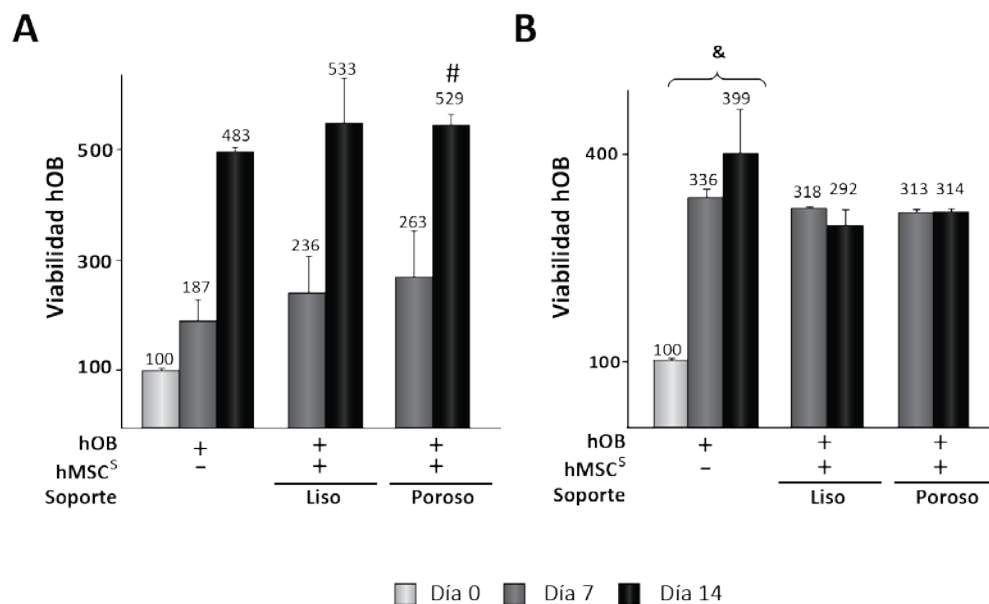
En primer lugar investigamos si la topografía de los soportes sobre los que se cultivan las hMSC<sup>S</sup> afecta a su viabilidad cuando éstas se cocultivan con hOB durante 14 días. En la Fig. 17A se muestran los resultados relativos a la actividad metabólica de hMSC<sup>S</sup> cocultivadas o no con hOB en medio de crecimiento. Tal y como habíamos detectado previamente, las células hMSC<sup>S</sup> se adhirieron en menor medida al soporte poroso (día 0) y su actividad metabólica incrementó a lo largo del tiempo de cultivo en medio de crecimiento tanto en los soportes lisos como en los porosos ( $p < 0,05$ ). Se observó que el cocultivo con hOB no afecta a la viabilidad de las hMSC<sup>S</sup>, independientemente del sustrato en el que hubieran sido cultivadas. Cuando el experimento se realizó empleando medios que favorecen la maduración osteoblástica, la actividad metabólica de las hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos incrementó más rápidamente que en medios de crecimiento, no detectándose diferencias entre el día 7 y 14. En estas condiciones experimentales, la viabilidad de las hMSC<sup>S</sup> también fue similar en cultivos aislados y en cocultivos con hOB (Fig. 17B). Cuando las hMSC<sup>S</sup> se sembraron sobre soportes porosos y se cultivaron aisladamente en medio osteogénico, se detectó un incremento de su actividad metabólica a lo largo de todo el periodo de observación. El cocultivo con hOB durante 7 días no alteró la viabilidad de las hMSC<sup>S</sup> sembradas en estos soportes, pero no permitió el posterior incremento de actividad metabólica detectado en cultivos aislados de hMSC<sup>S</sup>. A continuación, investigamos si la topografía de los soportes sobre los que se cultivan las hMSC<sup>S</sup> afecta a la viabilidad de hOB en cocultivo. Los datos obtenidos empleando tanto medio de crecimiento como osteogénico indicaron que la actividad metabólica de los hOB no se ve modificada por el cocultivo con hMSC<sup>S</sup>, independientemente del tipo de soporte (Fig. 18A-B).

##### **4.2. Efecto sobre la secreción de FN**

Se investigó si la topografía de los soportes sobre los que se cultivan las hMSC<sup>S</sup> tiene alguna influencia sobre los niveles de FN soluble en cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup> incubados durante 14 días en medios de crecimiento. En primer lugar realizamos una comparación entre la secreción de FN de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos y hOB. Se observó que los niveles de FN



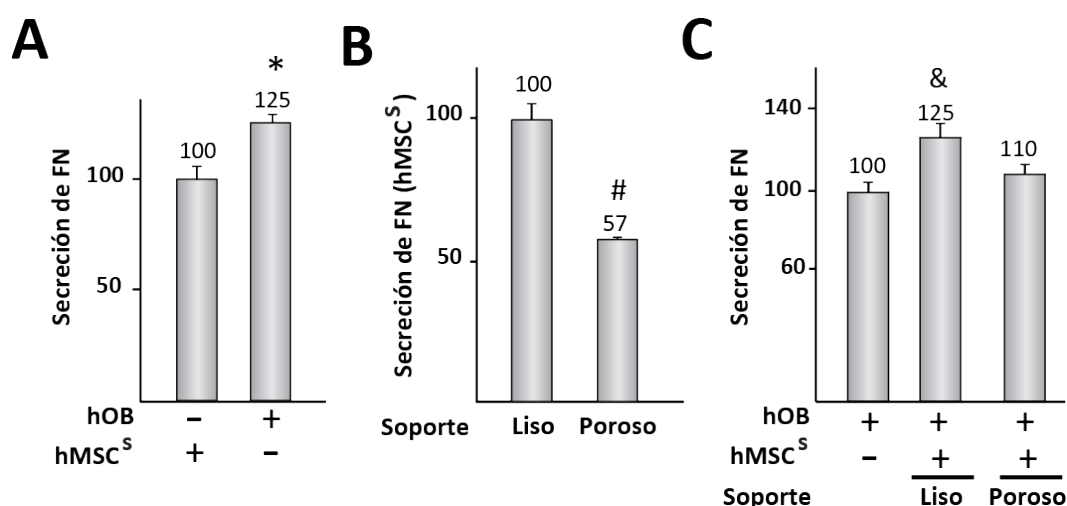
**Figura 17. Viabilidad celular de hMSC<sup>s</sup> sembradas en soportes lisos y porosos en cocultivo con hOB.** Las hMSC<sup>s</sup> se cultivaron de forma aislada sobre los soportes lisos o porosos durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con (A) hOB en medio de crecimiento u (B) osteogénico. La viabilidad de hMSC<sup>s</sup> se determinó inmediatamente antes de establecer los cocultivos (día 0) y tras 7 y 14 días de posterior incubación. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 0 de incubación de hMSC<sup>s</sup> cultivadas sobre soportes lisos. A estos datos se les otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de seis experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> sembradas en soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> cultivadas aisladamente en soporte poroso durante 14 días.



**Figura 18. Viabilidad celular hOB en cocultivos con hMSC<sup>s</sup> sembradas en soportes lisos y porosos.** Los hOB se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre diferentes soportes, en (A) medio de crecimiento u (B) osteogénico. La viabilidad celular de hOB se determinó inmediatamente antes de establecer los cocultivos (día 0) y tras 7 y 14 días de posterior incubación. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 0 de incubación de hOB. A estos datos se les otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de seis experimentos independientes. & $p < 0,05$  respecto a hOB cocultivados con hMSC<sup>s</sup> en soporte liso o poroso bajo las mismas condiciones experimentales.



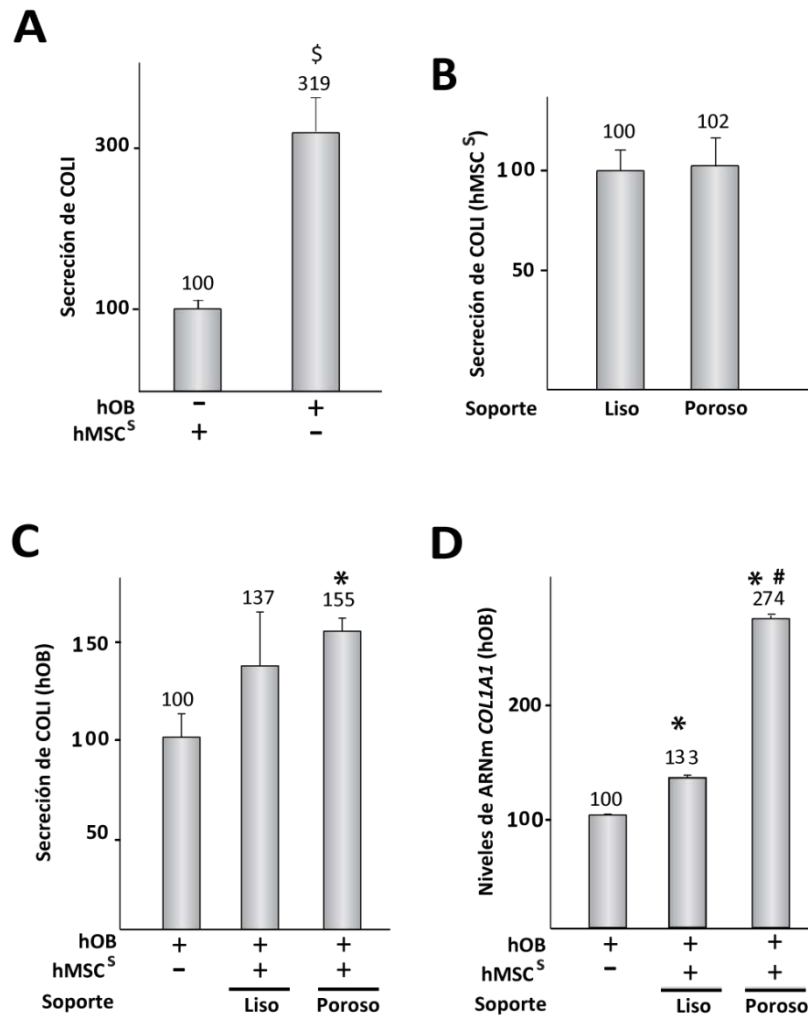
fueron superiores en los cultivos de hOB que de hMSC<sup>S</sup> (Fig. 19A). Además, las hMSC<sup>S</sup> secretaron menores cantidades cuando se cultivaron sobre el soporte poroso que sobre el liso (Fig. 19B). Los niveles de FN en cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos fueron ligeramente superiores a los detectados en hOB cultivados de forma aislada mientras que los cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes porosos presentaron niveles de FN soluble similares a los de hOB cultivados de forma aislada (Fig. 19C).



**Figura 19. Secreción de FN en cultivos de hMSC<sup>S</sup>, hOB y cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup>.** La concentración de FN se determinó en los medios de cultivo recolectados tras incubación durante 14 días en medio de crecimiento de (A) cultivos de hOB y de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos, (B) cultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos y (C) cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup>. Los hOB se incubaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre diferentes soportes. Los resultados se expresan como el porcentaje de la secreción de FN de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos (A, B) o de hOB cultivados aisladamente (C). Estos valores fueron de  $4,2 \pm 0,3$  y de  $5,3 \pm 0,2$  ng/ml en el caso de hMSC<sup>S</sup> y hOB, respectivamente, y se les otorgó un valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de seis experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup>; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas en soporte liso; & $p < 0,05$  respecto a las otras dos condiciones experimentales.

#### 4.3. Efecto sobre marcadores de fenotipo osteoblástico: COLI, FA, osteocalcina y grado de mineralización

Nos propusimos investigar si la topografía del soporte sobre el que se cultivan las hMSC<sup>S</sup> tiene alguna influencia sobre la funcionalidad de hOB como células formadoras de hueso. Para ello, analizamos cambios en la secreción de COLI y expresión del gen *COL1A1*, la actividad FA y expresión del gen *ALPL*, la expresión del gen *BGLAP* que codifica osteocalcina y la capacidad de mineralización de hOB cocultivados con hMSC<sup>S</sup>.



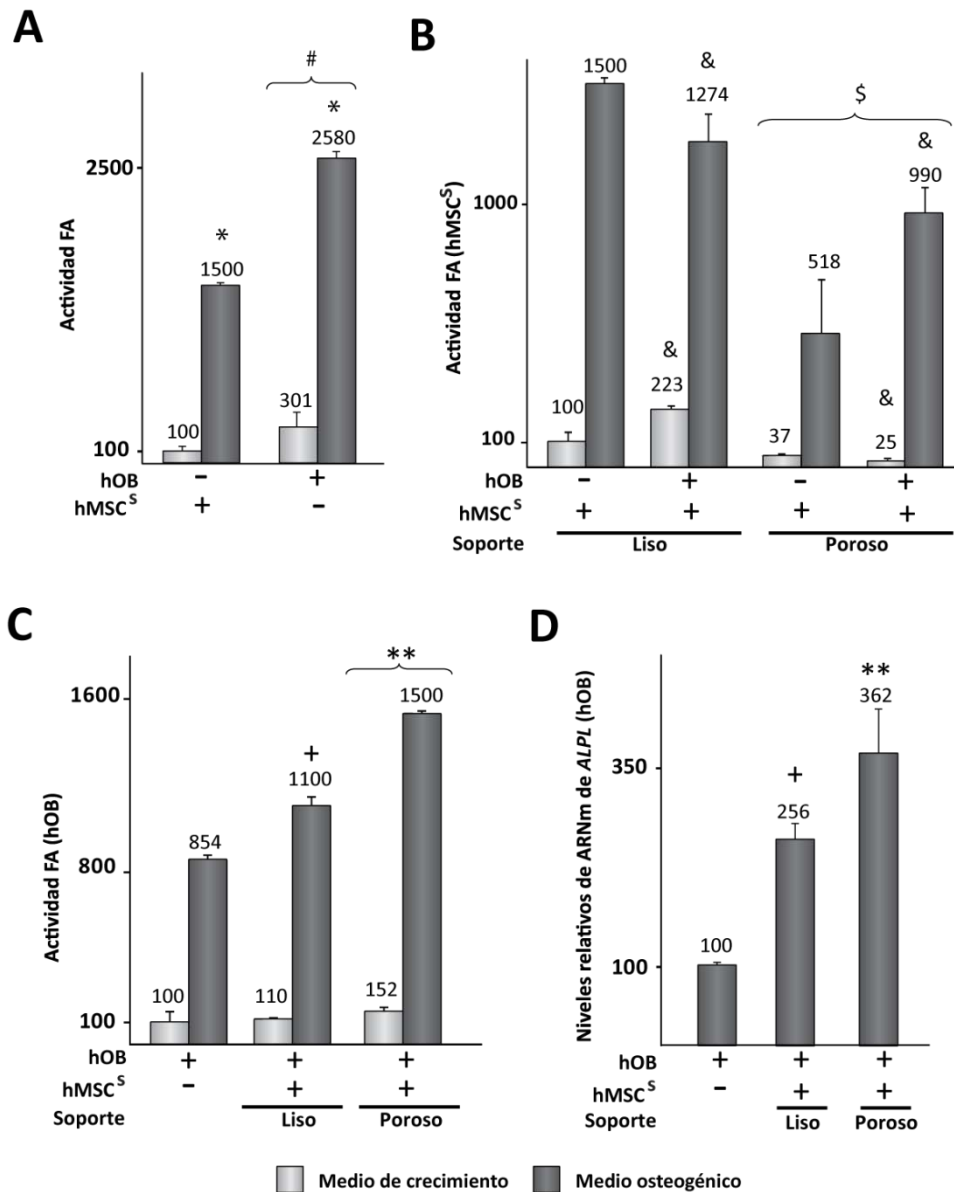
**Figura 20. Secreción de COLI en cultivos de hMSC<sup>s</sup>, hOB y cocultivos de hMSC<sup>s</sup> y hOB. Cambios en los niveles de ARNm de COL1A1 en hOB cocultivos con hMSC<sup>s</sup>.** La concentración de COLI se determinó en los medios de cultivo recolectados tras incubación durante 14 días en medio de crecimiento de (A) cultivos aislados de hOB y de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos, (B) cultivos aislados de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos y (C) cocultivos de hOB y hMSC<sup>s</sup>. Los hOB se incubaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre diferentes soportes. Los resultados se expresan como el porcentaje de la secreción de COLI de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos (A, B) o de hOB cultivados aisladamente (C). Estos valores fueron de  $59 \pm 5$  y  $189 \pm 23$  ng/ml en el caso de hMSC<sup>s</sup> y hOB, respectivamente, y se les otorgó un valor arbitrario de 100. (D) Niveles de ARNm de COL1A1 en hOB cocultivos o no como en (C). Los resultados se expresan como el porcentaje de ARNm de COL1A1 en hOB cultivados de forma aislada en medio de crecimiento, al que se le otorgó el valor de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de seis experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente; # $p < 0,05$  respecto a hOB cocultivos con hMSC<sup>s</sup> sembradas en soporte liso.

Con el fin de estudiar cambios en la secreción de COLI, los cultivos de hMSC<sup>s</sup>, hOB y cocultivos de ambos tipos celulares se incubaron durante 14 días en medio de crecimiento. La comparación entre la secreción de hMSC<sup>s</sup> sembradas en soportes lisos y hOB indicó una mayor secreción por parte de estos últimos (Fig. 20A). El cultivo de hMSC<sup>s</sup> sobre soporte poroso no afectó a la secreción de esta proteína (Fig. 20B). Sin embargo, la secreción de COLI en cocultivos de hOB con hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes porosos fue superior a la detectada

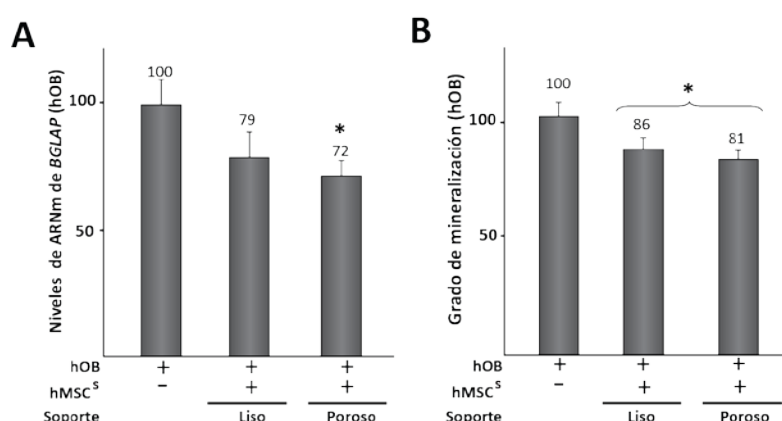
en hOB cultivados aisladamente (Fig. 20C). Quisimos determinar si este incremento en la secreción estaba relacionado con un incremento en la expresión a nivel de ARNm del gen *COL1A1*. Observamos que los hOB cocultivados con hMSC<sup>S</sup> presentaban niveles mayores de ARNm de *COL1A1* que los hOB cultivados aisladamente (Fig. 20D), siendo los de hOB cocultivados con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes porosos unas dos veces superiores a los de hOB cocultivados con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre sustratos lisos.

Los cambios en la actividad FA se estudiaron en cultivos de hMSC<sup>S</sup>, hOB y cocultivos de ambos tipos celulares incubados durante 14 días en medio de crecimiento o en medio osteogénico. La actividad de hMSC<sup>S</sup> cultivadas de forma aislada durante 14 días sobre soporte liso en medio de crecimiento fue menor que la de cultivos de hOB aislados (Fig. 21A). Al cultivar ambos tipos celulares en medio osteogénico, se observó un incremento notable de la actividad FA, que fue superior en el caso de los OB. La actividad de esta enzima en hMSC<sup>S</sup> cultivadas en medio de crecimiento sobre soportes porosos fue menor que en hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos. Sin embargo, la actividad FA se estimuló de forma similar cuando las células se sembraron en soportes porosos y se incubaron en medio osteogénico (Fig. 21B). El cocultivo con hOB disminuyó ligeramente la actividad FA de hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos, mientras que la incrementó significativamente cuando las hMSC<sup>S</sup> se sembraron sobre soportes porosos. En cuanto a los hOB, se observó un incremento en su actividad FA cuando se cocultivaron con hMSC<sup>S</sup> en medio osteogénico, independientemente del soporte sobre el que las hMSC<sup>S</sup> se hubieran cultivado, siendo muy superior la actividad detectada cuando las hMSC<sup>S</sup> habían sido sembradas en soportes porosos (Fig. 21C). Estos datos se correlacionaron con cambios en los niveles de ARNm del gen *ALPL*, que incrementaron en hOB cocultivados con hMSC<sup>S</sup> en comparación con cultivos de hOB aislados y fueron superiores en cocultivos en los que las hMSC<sup>S</sup> fueron sembradas en soportes porosos (Fig. 21D).

A continuación se investigó el efecto que ejercen las hMSC<sup>S</sup> sobre actividades características de la diferenciación terminal de los osteoblastos. Para ello, los hOB se cultivaron durante 14 días en medio osteogénico, de forma aislada o en cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos, y se cuantificaron los niveles relativos de ARNm de *BGLAP* en los hOB, así como su capacidad de mineralización. Los niveles de ARNm de *BGLAP* fueron significativamente menores en hOB cocultivados con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes porosos que en hOB cultivados de forma aislada (Fig. 22A). Finalmente, observamos que el cocultivo con hMSC<sup>S</sup> disminuyó la formación de nódulos minerales en la capa de células hOB, independientemente del soporte sobre el que hubieran sido sembradas (Fig. 22B).



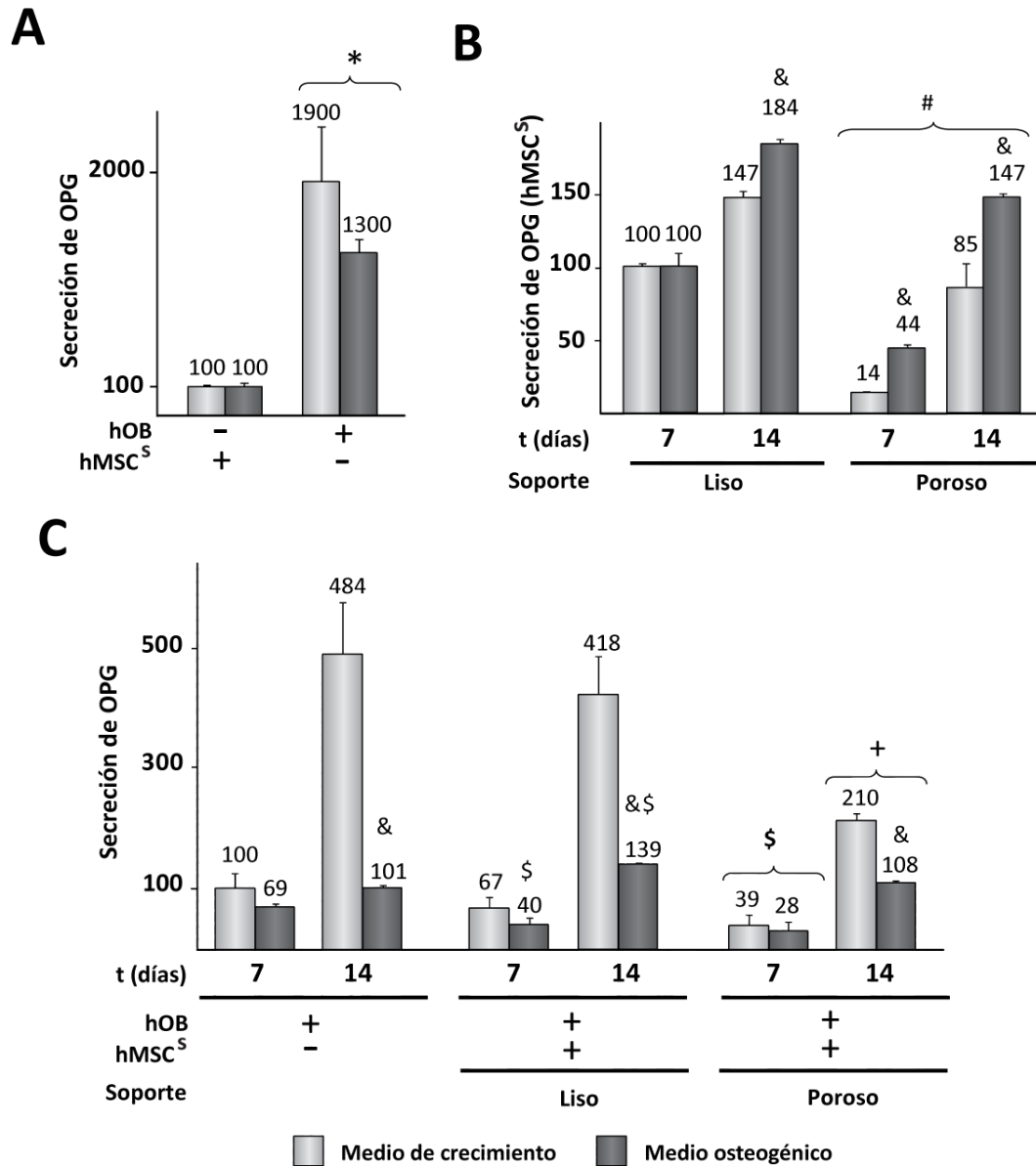
**Figura 21. Actividad FA en cultivos de hMSC<sup>s</sup>, hOB y cocultivos de hOB y hMSC<sup>s</sup>. Cambios en los niveles de ARNm de ALPL en hOB cocultivados con hMSC<sup>s</sup>.** La actividad FA se determinó en la monocapa celular tras incubación durante 14 días en medio de crecimiento u osteogénico de (A) cultivos aislados de hOB y de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos, (B) cultivos aislados de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos y (C) cocultivos de hOB y hMSC<sup>s</sup>. Los hOB se incubaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre diferentes soportes. Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad enzimática de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos (A, B) o de hOB (C), cultivados aisladamente en medio de crecimiento. Estos valores fueron de  $5,4 \pm 2$  y de  $16 \pm 6,2$  nmoles p-nitrofenol /mg proteína/min en el caso de hMSC<sup>s</sup> y hOB, respectivamente, y se les otorgó un valor arbitrario de 100. (D) Niveles de ARNm de ALPL en hOB cocultivados o no como en (C). Los resultados se expresan como el porcentaje de ARNm de ALPL en hOB cultivados aisladamente, al que se le otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de seis experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto al mismo tipo celular en medio de crecimiento; <sup>#</sup> $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> bajo las mismas condiciones experimentales; <sup>&</sup> $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> cultivadas aisladamente en el mismo tipo de soporte bajo las mismas condiciones experimentales; <sup>\$</sup> $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> cultivadas en soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; <sup>+</sup> $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente en medio osteogénico; <sup>\*\*</sup> $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente o cocultivados con hMSC<sup>s</sup> sembradas en soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales.



**Figura 22. Niveles relativos de ARNm de BGLAP y grado de mineralización en hOB cocultivados con hMSC<sup>5</sup>.** (A) Niveles relativos de ARNm de BGLAP y (B) grado de mineralización de la capa celular de hOB cocultivados con hMSC<sup>5</sup>. Los hOB se incubaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>5</sup> sembradas sobre diferentes soportes. Los resultados se expresan como el porcentaje de los niveles relativos de ARNm de BGLAP (A) o del grado de mineralización (B) en cultivos aislados de hOB, a los que se le otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente.

#### 4.4. Efecto sobre la secreción de OPG y RANKLs

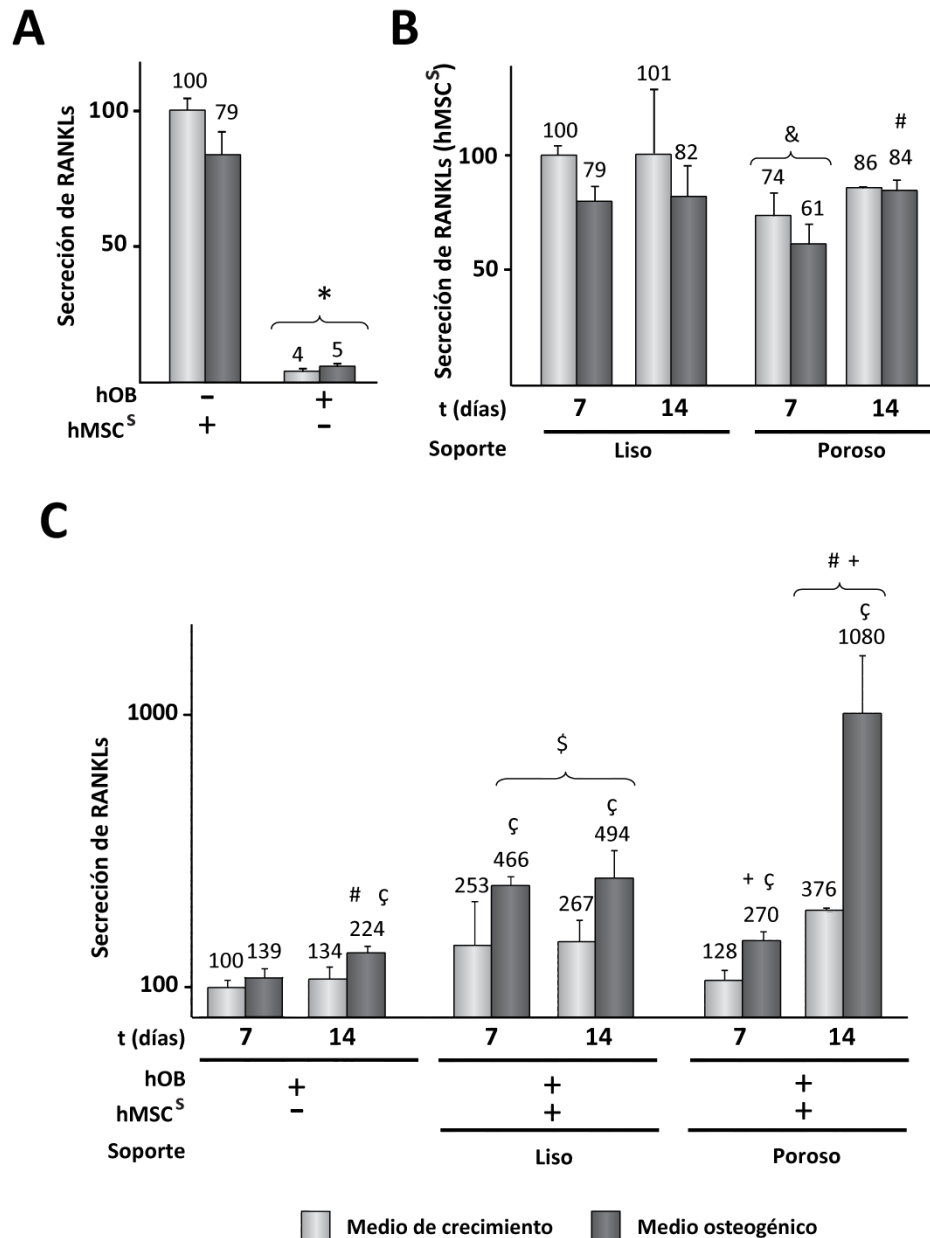
En primer lugar se estudió la secreción de OPG en cultivos de hOB y hMSC<sup>5</sup> sembradas en soportes lisos, que fueron incubados en medios de crecimiento u osteogénico durante 7 días. Se detectó que los hOB secretan más OPG que las hMSC<sup>5</sup> y que, para un mismo tipo celular, no existen diferencias en la secreción de esta proteína en función del tipo de medio de cultivo (Fig. 23A). La secreción de OPG aumentó en ambos tipos celulares cuando la incubación se prolongó hasta 14 días en medio de crecimiento ( $p < 0,05$ ), siendo el incremento muy superior en hOB (Fig. 23B-C). El cultivo en medio osteogénico durante 14 días tuvo un efecto muy diferente en hMSC<sup>5</sup> y hOB. En comparación con cultivos incubados en medio de crecimiento, el cultivo en medio osteogénico aumentó la secreción de OPG en hMSC<sup>5</sup> mientras que la disminuyó notablemente en cultivos de hOB. La secreción de OPG fue menor en cultivos de hMSC<sup>5</sup> sembradas sobre soportes porosos que sobre soportes lisos, en todas las condiciones experimentales (Fig. 23B). En comparación con cultivos aislados de hOB, el cocultivo de hOB y hMSC<sup>5</sup> sembradas sobre soporte liso tuvo efectos poco importantes sobre los niveles de OPG, detectándose un ligero incremento en cocultivos incubados durante 14 días en medio osteogénico (Fig. 23C). En el caso de cocultivos con hMSC<sup>5</sup> sembradas sobre soportes porosos, se detectaron importantes variaciones al cultivar en medio de crecimiento, ya que tras 7 y 14 días de cultivo los niveles de OPG fueron notablemente inferiores a los de cultivos aislados de hOB. En los cultivos en medio osteogénico, se detectó asimismo una disminución en los niveles de OPG tras 7 días de incubación.



**Figura 23. Secreción de OPG en cultivos de hMSC<sup>s</sup>, hOB y cocultivos de hOB y hMSC<sup>s</sup>.** La concentración de OPG se determinó en los medios de cultivo recolectados tras incubación durante 7 y 14 días en medio de crecimiento u osteogénico de (A) cultivos aislados de hOB y de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos, (B) cultivos aislados de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos y (C) cocultivos de hOB y hMSC<sup>s</sup>. Los hOB se incubaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre diferentes soportes. Los resultados se expresan como el porcentaje de la secreción de OPG en hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos (A, B) o de hOB (C), cultivados aisladamente en medio de crecimiento durante 7 días. Estos valores fueron de  $64,3 \pm 29$  y de  $1227 \pm 288$  pg/ml en el caso de hMSC<sup>s</sup> y hOB, respectivamente, y se les otorgó un valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> cultivadas sobre soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; & $p < 0,05$  respecto a células cultivadas en medio de crecimiento bajo las mismas condiciones experimentales; \$ $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente bajo las mismas condiciones experimentales; + $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente y cocultivos de hOB y hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales.

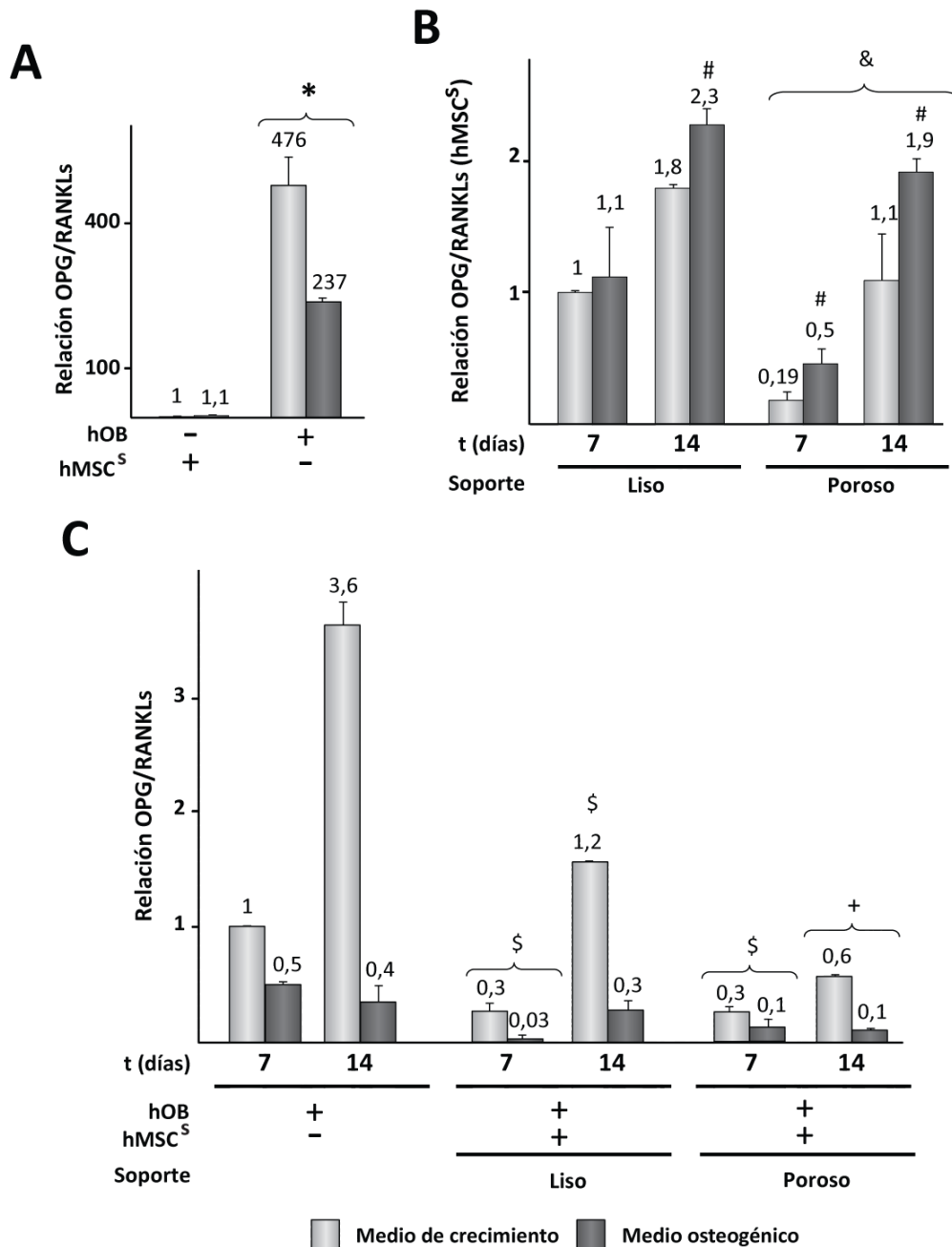
A continuación se estudió la secreción de RANKL soluble (RANKLs) en cultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soporte liso, que se incubaron en medios de crecimiento u osteogénico durante 7 días. Los niveles de RANKLs fueron muy superiores en cultivos de hMSC<sup>S</sup> (Fig. 24A). En ambos tipos celulares, la secreción de RANKLs fue similar en medio de crecimiento o en medio osteogénico. La secreción de hMSC<sup>S</sup> en soportes lisos no se modificó al incrementar el tiempo de incubación a 14 días, siendo asimismo similar la concentración de la proteína en cultivos incubados en medio de crecimiento u osteogénico (Fig. 24B). El cultivo en soportes porosos redujo la secreción de RANKLs por las hMSC<sup>S</sup> tras 7 días de incubación en medio de crecimiento y osteogénico. Además, en cultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes porosos, la secreción de RANKLs aumentó ligeramente al prolongar el tiempo de incubación en medio osteogénico. La secreción de RANKLs en cultivos de hOB se mantuvo invariable al incrementar el tiempo de incubación en medio de crecimiento, pero aumentó significativamente al cultivarlos en medio osteogénico (Fig. 24C). Si comparamos los niveles de RANKLs en cultivos de hOB aislados con los detectados en los cocultivos, se observa una tendencia general de incremento de la secreción. Los cocultivos en los que las hMSC<sup>S</sup> se sembraron en soportes porosos experimentaron un incremento en los niveles de RANKLs con el tiempo de incubación, siendo este aumento especialmente notable en medio osteogénico. Este incremento no se detectó en el caso de cocultivos en los que las hMSC<sup>S</sup> se sembraron sobre soportes lisos.

La relación existente entre OPG y RANKLs es considerada una buena herramienta para caracterizar el estado en el que se encuentra una población celular en relación al remodelado óseo (Silva, 2011). La relación OPG/RANKLs es considerablemente más alta en cultivos de hOB que en hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso, incubados tanto en medio de crecimiento como osteogénico (Fig. 25A). Sin embargo, mientras que en los hOB este *ratio* disminuye drásticamente tras cultivarlos en medio osteogénico ( $p < 0,05$ ), en las hMSC<sup>S</sup> permanece invariable o incluso aumenta al cabo de 14 días de cultivo (Fig. 25A-B). En ambos tipos celulares cultivados aisladamente en medio de crecimiento, la relación OPG/RANKLs aumenta con el tiempo de cultivo ( $p < 0,05$ ), siendo este incremento mucho más acusado en cultivos de hOB. La relación OPG/RANKLs es menor en hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes porosos que sobre soportes lisos (Fig. 25B), pero se estimula de forma mucho más acusada al incrementar el tiempo de cultivo sobre soportes porosos, tanto en medio de crecimiento como osteogénico. En comparación a hOB cultivados de forma aislada, la relación OPG/RANKLs presenta una tendencia general de disminución en los cocultivos. Tras 14 días de cultivo, la relación OPG/RANKLs en cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes porosos fue inferior a la de cocultivos en los que las hMSC<sup>S</sup> se sembraron en soportes lisos (Fig. 25C).



**Figura 24. Secreción de RANKLs en cultivos de hMSC<sup>S</sup>, hOB y cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup>.** La concentración de RANKLs se determinó en el medio de cultivo tras incubación durante 7 y 14 días en medio de crecimiento u osteogénico de (A) cultivos aislados de hOB y de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos, (B) cultivos aislados de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos y (C) cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup>. Los hOB se incubaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre diferentes soportes. Los resultados se expresan como el porcentaje de la secreción de RANKLs en hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos (A, B) o de hOB (C), cultivados aisladamente en medio de crecimiento durante 7 días. Estos valores fueron de  $3,64 \pm 0,58$  y de  $0,14 \pm 0,04$  pM en el caso de hMSC<sup>S</sup> y hOB, respectivamente, y se les otorgó un valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto al día 7 bajo las mismas condiciones experimentales; & $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; § $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente bajo las mismas condiciones experimentales; ζ $p < 0,05$  respecto a las mismas condiciones experimentales en medio de crecimiento; + $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente o a cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales.

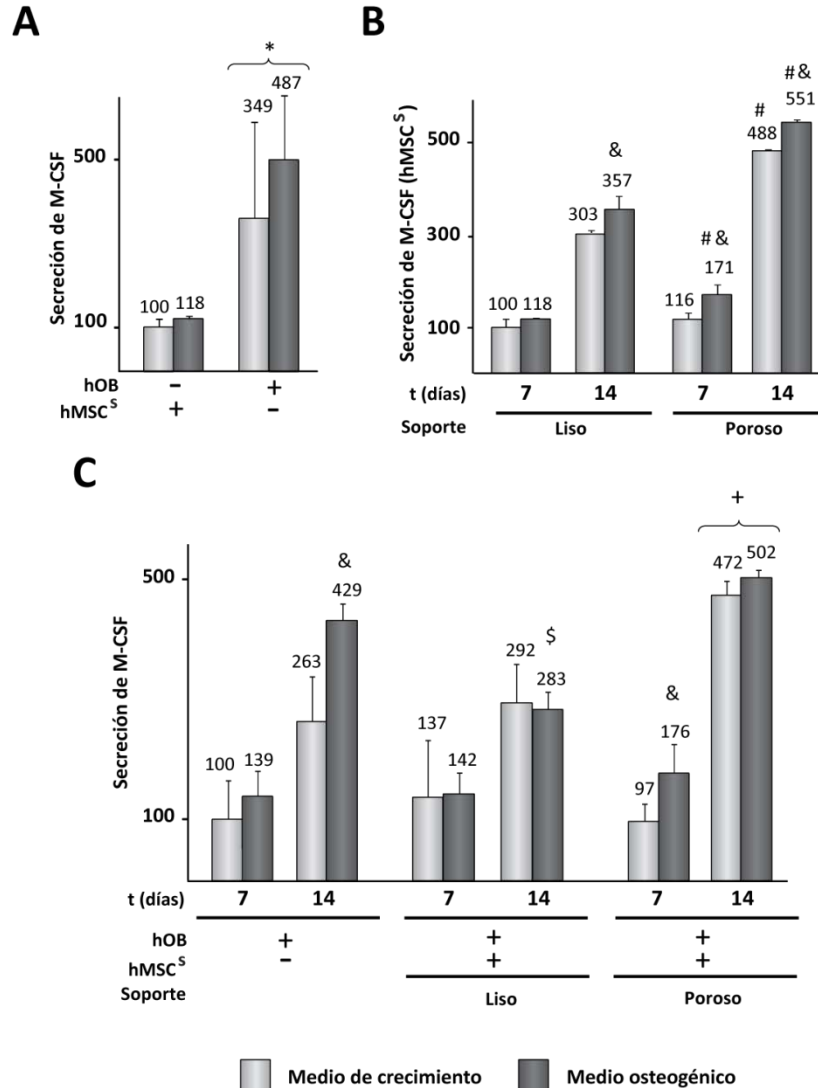




**Figura 25. Relación OPG/RANKLs en cultivos de hMSC<sup>s</sup>, hOB y cocultivos de hOB y hMSC<sup>s</sup>.** Relación OPG/RANKLs expresada como el cociente de los valores de secreción de OPG y RANKLs, determinados en el medio de cultivo tras incubación durante 7 y 14 días en medio de crecimiento u osteogénico de (A) cultivos aislados de hOB y de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos, (B) cultivos aislados de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos y (C) cocultivos de hOB y hMSC<sup>s</sup>. Los hOB se incubaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre diferentes soportes. Los resultados se expresan como la relación OPG/RANKLs en hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos (A, B) o de hOB (C), cultivados aisladamente en medio de crecimiento durante 7 días. A estos valores se les otorgó un valor arbitrario de 1. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a células cultivadas en medio de crecimiento bajo las mismas condiciones experimentales; & $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> cultivadas sobre soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; \$ $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente bajo las mismas condiciones experimentales; + $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente y a cocultivos de hOB y hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales.

#### 4.5. Efecto sobre la secreción de M-CSF

En primer lugar se estudiaron las posibles diferencias en la secreción de M-CSF entre cultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos, que fueron incubados durante 7 días en medios de crecimiento u osteogénico (Fig. 26A).



**Figura 26. Secreción de M-CSF en cultivos de hMSC<sup>S</sup>, hOB y cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup>.** La concentración de M-CSF se determinó en el medio de cultivo tras incubación durante 7 y 14 días en medio de crecimiento u osteogénico de (A) cultivos aislados de hOB y de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos, (B) cultivos aislados de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos y (C) cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup>. Los hOB se incubaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre diferentes soportes. Los resultados se expresan como el porcentaje de la secreción de M-CSF de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos (A, B) o de hOB (C) cultivados aisladamente en medio de crecimiento durante 7 días. Estos valores fueron de  $14 \pm 2,8$  y de  $51 \pm 32$  pg/ml en el caso de hMSC<sup>S</sup> y hOB, respectivamente, y se les otorgó un valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; & $p < 0,05$  respecto a células cultivadas en medio de crecimiento bajo las mismas condiciones experimentales; \$ $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente bajo las mismas condiciones experimentales; + $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente y a cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos bajo las mismas condiciones experimentales.

Los niveles de M-CSF en los medios de cultivo de hOB fueron mayores que en los de hMSC<sup>S</sup>, tanto en medio de crecimiento como osteogénico. Ni en hMSC<sup>S</sup> ni en hOB cultivados durante 7 días se observaron diferencias entre los niveles cuantificados en medios de crecimiento u osteogénico. En ambos tipos celulares la secreción de este factor aumentó al prolongar el tiempo de cultivo hasta 14 días ( $p<0,05$ ), tanto en medio de crecimiento como en medio osteogénico (Fig. 26B-C), siendo los niveles de M-CSF superiores en aquellos cultivos incubados en medio osteogénico. El cultivo de hMSC<sup>S</sup> sobre soportes porosos aumentó acusadamente la secreción de M-CSF tras 14 días de cultivo (Fig. 26B), detectándose asimismo diferencias significativas entre los valores cuantificados en medio de crecimiento y osteogénico tras 7 y 14 días de cultivo.

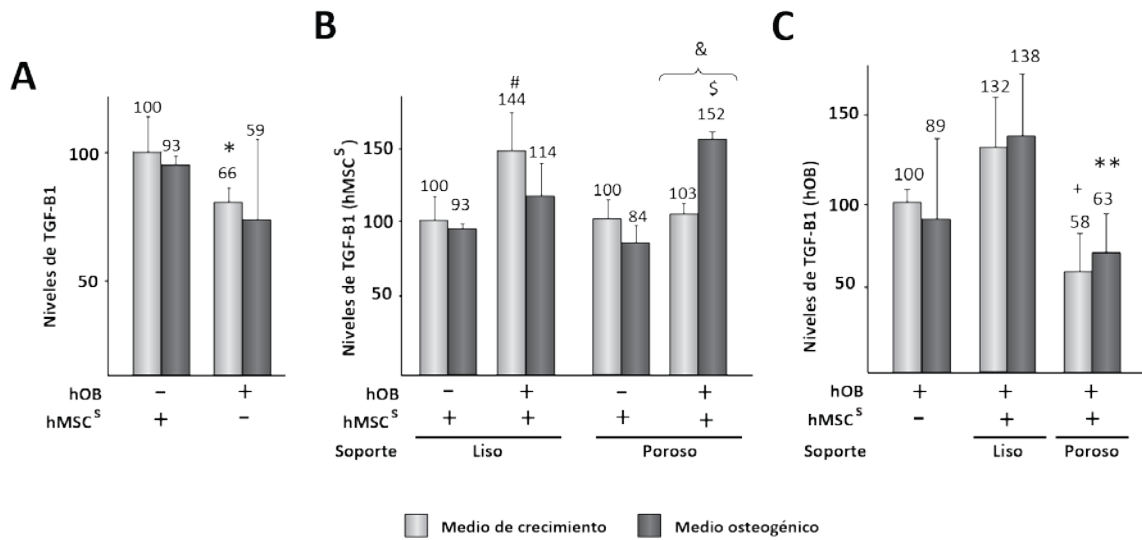
Al comparar la secreción entre hOB cultivados aisladamente o cocultivos durante 7 días, no se detectaron cambios relevantes en función de que las hMSC<sup>S</sup> hubieran sido sembradas en soportes lisos o porosos o de que las incubaciones hubieran sido realizadas en medios de crecimiento u osteogénico. Sin embargo, en comparación con cultivos de hOB aislados, los niveles de M-CSF disminuyeron tras cocultivarlos durante 14 días en medio osteogénico con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos, mientras que no se detectaron diferencias significativas en cocultivos incubados en medio de crecimiento. A este mismo tiempo de incubación, se observó un incremento en la secreción de M-CSF en cocultivos de hOB en los que las hMSC<sup>S</sup> habían sido sembradas en soportes porosos, siendo similares los niveles del factor en medios de crecimiento y osteogénico.

#### **4.6. Efecto sobre los niveles de TGF- $\beta$ 1 en la capa celular**

En primer lugar, se compararon los niveles de TGF- $\beta$ 1 entre cultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soporte liso, que se cultivaron durante 14 días (Fig. 27A). Los niveles de TGF- $\beta$ 1 cuantificados en las monocapas de hOB fueron menores que en las de hMSC<sup>S</sup> cuando se cultivaron en medio de crecimiento, no detectándose diferencias significativas tras el cultivo en medio osteogénico. Los niveles de TGF- $\beta$ 1 en hMSC<sup>S</sup> cultivadas aisladamente sobre soportes lisos o porosos fueron similares (Fig. 27B). En el caso de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soporte liso, el cocultivo con hOB aumentó la producción de TGF- $\beta$ 1 cuando la incubación se realizó en medio de crecimiento. No ocurrió así en las hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soporte poroso, en las que el cocultivo con hOB estimuló la producción de TGF- $\beta$ 1 en los cultivos en medio osteogénico.

A continuación, determinamos cambios en los niveles de TGF- $\beta$ 1 en la monocapa de hOB cultivados durante 14 días en medio de crecimiento u osteogénico de forma aislada o cocultivos con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso o poroso. Los niveles de TGF- $\beta$ 1 de los hOB

no experimentaron cambios significativos tras el cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso (Fig. 27C). Sin embargo, el cocultivo en medio de crecimiento de hOB con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte poroso indujo una disminución muy acusada de los niveles de TGF- $\beta$ 1 respecto a hOB cultivados aisladamente o en cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso. Cuando la incubación se realizó en medio osteogénico, los niveles de los hOB cocultivos con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte poroso fueron menores que los de hOB cocultivos con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso.



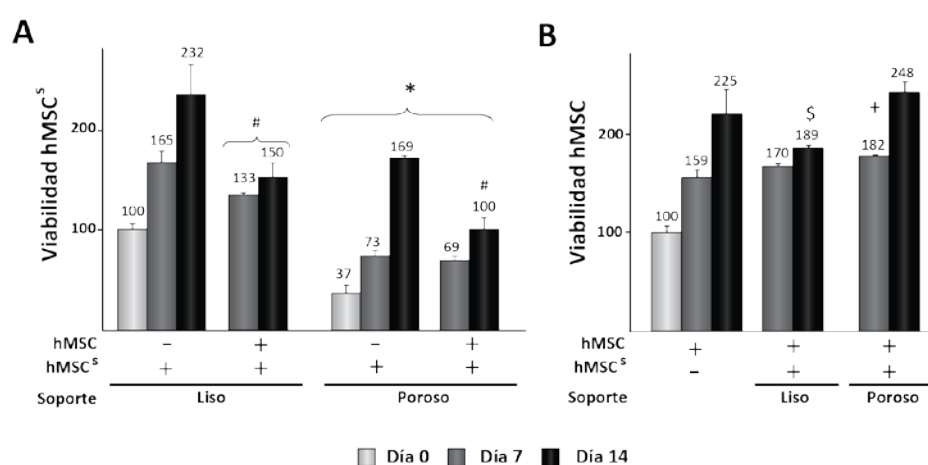
**Figura 27. Niveles de TGF- $\beta$ 1 en cultivos de hMSC<sup>S</sup>, hOB y cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup>.** La concentración de TGF- $\beta$ 1 se determinó en la capa celular tras incubación durante 14 días en medio de crecimiento o en medio osteogénico de (A) cultivos aislados de hOB y de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos, (B) cultivos aislados de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos y (C) cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup>. Los hOB se incubaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre diferentes soportes. Los resultados se expresan como el porcentaje de TGF- $\beta$ 1 en hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos (A, B) o de hOB (C), cultivados aisladamente en medio de crecimiento. Estos valores fueron de  $0,29 \pm 0,05$  y de  $0,12 \pm 0,01$  ng/ml por  $\mu$ g de proteína en el caso de hMSC<sup>S</sup> y hOB, respectivamente, y se les otorgó un valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de cinco experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> en medio de crecimiento; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas aisladamente en soporte liso en medio de crecimiento; & $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso y cocultivadas con hOB bajo las mismas condiciones experimentales; \$ $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas aisladamente en soporte poroso en medio osteogénico; + $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente o cocultivos con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso, en medio de crecimiento; \*\* $p < 0,05$  respecto a hOB en cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso, en medio osteogénico.

## 5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE hMSC<sup>S</sup> CULTIVADAS EN SOPORTES POROSOS SOBRE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

En este apartado nos propusimos investigar si la topografía del sustrato en el que se cultivan las hMSC<sup>S</sup> modula la actividad paracrina que estas células ejercen sobre otras poblaciones de hMSC. Para ello, cocultivamos hMSC con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos o porosos, en ausencia de contacto directo.

### 5.1. Efecto sobre la viabilidad celular

En primer lugar se estudió la influencia que ejercen las hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos o porosos sobre la viabilidad de hMSC con las que no establecen contacto directo así como el efecto de dichas hMSC en la viabilidad de hMSC<sup>S</sup>. Para ello se establecieron cocultivos de hMSC con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos, determinándose la actividad metabólica de las diferentes poblaciones celulares al cabo de 7 y 14 días de incubación. En concordancia con lo observado previamente, detectamos que si bien la viabilidad de las hMSC<sup>S</sup> cultivadas de forma aislada era menor en los soportes porosos que en los lisos, ésta incrementa en el tiempo de forma más acusada sobre los soportes porosos (Fig. 28A).

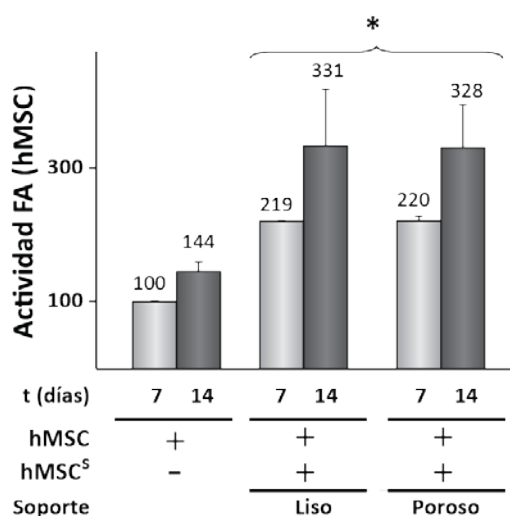


**Figura 28. Viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> y hMSC sembradas en soportes lisos o porosos.** Las hMSC<sup>S</sup> y las hMSC se cultivaron de forma aislada sobre los correspondientes soportes durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación en medio de crecimiento con hMSC o hMSC<sup>S</sup>, respectivamente. La viabilidad celular se determinó inmediatamente antes de establecer los cocultivos (día 0) y tras 7 y 14 días de incubación. Se muestra la viabilidad de hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos o porosos y cocultivadas (+) o no (-) con hMSC (A) así como la viabilidad de hMSC cocultivadas (+) o no (-) con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre los soportes (B). Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 0 de incubación de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos (A) o de hMSC cultivadas aisladamente (B). A estos datos se les otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas aisladamente sembradas en un mismo soporte; § $p < 0,05$  respecto a hMSC cultivadas de forma aislada o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes porosos, durante 14 días; +  $p < 0,05$  respecto a hMSC cultivadas aisladamente durante 7 días.

El cocultivo con hMSC disminuyó la actividad metabólica de las hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre ambos tipos de soportes. En el caso de los soportes lisos, esta disminución se detectó al cabo de 7 días de cocultivo, mientras que en el caso de los soportes porosos este efecto se observó tras 14 días. Por otro lado, se detectó una disminución de la viabilidad de las células hMSC cocultivadas durante 14 días con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso (Fig. 28B). Sin embargo, el cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte poroso no afectó la viabilidad celular de las hMSC, que fue similar a la detectada en cultivos aislados.

## 5.2. Efecto sobre la actividad FA de hMSC

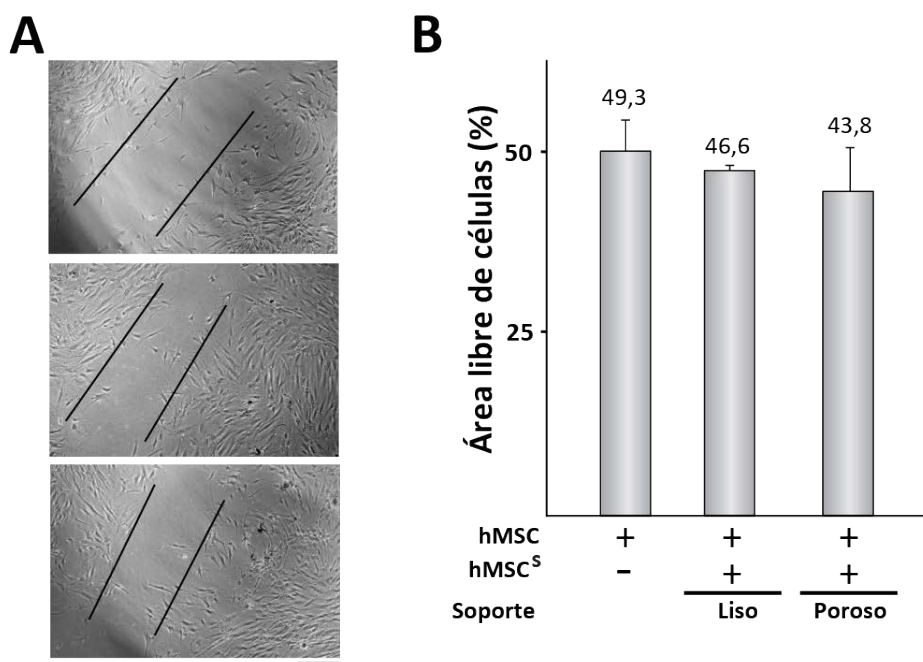
A continuación se investigó la influencia de la topografía del sustrato en el que se cultivan las hMSC<sup>S</sup> sobre la actividad FA de hMSC cocultivadas. Para ello, los cultivos se incubaron en medio osteogénico y al cabo de 7 y 14 días se determinó la actividad enzimática de hMSC cultivadas aisladamente o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup>. La actividad FA aumentó con el tiempo de cultivo tanto en hMSC cultivadas aisladamente como en hMSC cocultivadas ( $p < 0,05$ ) (Fig. 29). El cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos aumentó la actividad FA de hMSC respecto a hMSC cultivadas aisladamente, no detectándose diferencias entre ambos tipos de cocultivos.



**Figura 29. Actividad FA de hMSC cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos.** Las hMSC se cultivaron de forma aislada sobre los correspondientes soportes durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación en medio osteogénico con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos. Las células se incubaron durante 7 ó 14 días en medio osteogénico y se cuantificó la actividad FA en la capa celular de los cultivos de hMSC. Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad enzimática de hMSC cultivadas aisladamente durante 7 días. Este valor fue de  $7,52 \pm 0,26$  nmoles p-nitrofenol/mg proteína/min y se le otorgó un valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC cultivadas aisladamente bajo las mismas condiciones experimentales.

### 5.3. Efecto sobre la migración de hMSC

A continuación se estudió la influencia de las hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos sobre la migración de hMSC. Para ello se rasgó la monocapa de hMSC y a continuación se cocultivaron con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos durante 48 h. Al cabo de este tiempo se cuantificó el área libre de células, no observándose diferencias significativas entre las hMSC cultivadas aisladamente y las cocultivadas (Fig. 30).



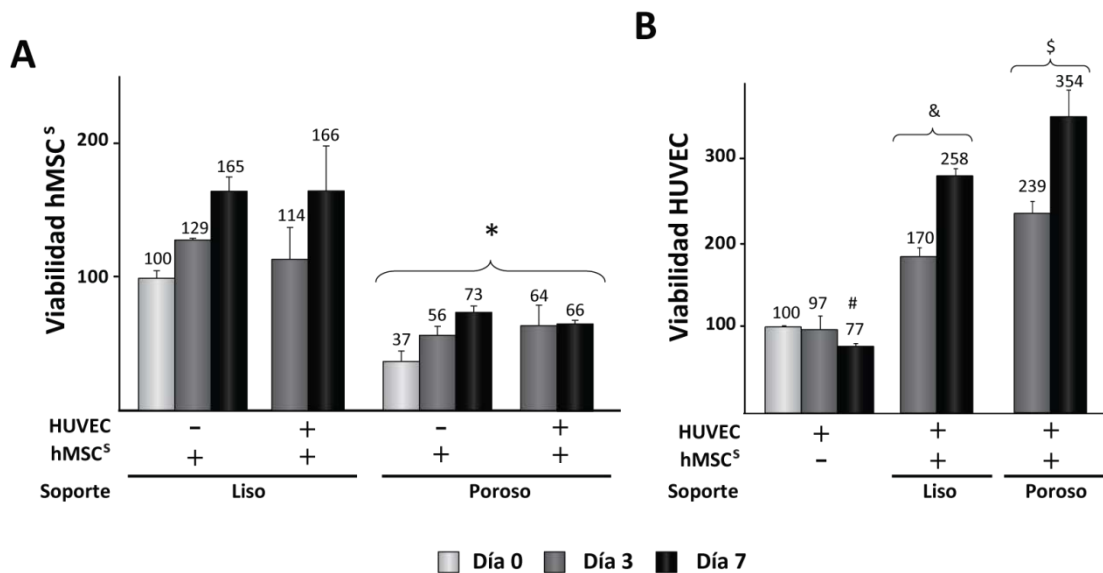
**Figura 30. Migración de hMSC cocultivadas con hMSC<sup>S</sup>.** Las hMSC se cultivaron hasta confluencia, tras lo que se rasgó la monocapa, cocultivándose a continuación durante 48 h con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos. (A) Imágenes representativas del área libre de hMSC cultivadas aisladamente (arriba), cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soporte liso (centro) o con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soporte poroso (abajo), tras 48 h de incubación. Barra=0,5 mm. (B) Cuantificación del área libre de hMSC. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje del área libre de células al cabo de 48 h con respecto al inicio del cocultivo. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras, ± DE de tres experimentos independientes.

## 6. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE hMSC<sup>S</sup> CULTIVADAS EN SOPORTES POROSOS SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES

En este apartado investigamos si la topografía del sustrato en el que se cultivan las hMSC<sup>S</sup> modula la actividad paracrina que estas células ejercen sobre células endoteliales. Para ello, cocultivamos células HUVEC y hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos o porosos, en ausencia de contacto directo.

### 6.1. Efecto sobre la viabilidad celular

En primer lugar se estudió si el cocultivo de células HUVEC y hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos o porosos afecta a la viabilidad de uno u otro tipo celular. El cocultivo con células HUVEC no alteró la viabilidad de las hMSC<sup>S</sup>, independientemente del tipo de soporte sobre el que las células madre hubieran sido cultivadas (Fig. 31A). Por otro lado, la actividad metabólica de las células HUVEC cultivadas aisladamente no incrementó durante el periodo de observación, disminuyendo incluso tras 7 días de cultivo (Fig. 31B). Sin embargo, el cocultivo con hMSC<sup>S</sup> indujo un incremento muy notable en la viabilidad de las células HUVEC a lo largo del periodo de observación, siendo superior en aquellos cocultivos en que los que las hMSC<sup>S</sup> se sembraron en soportes porosos.

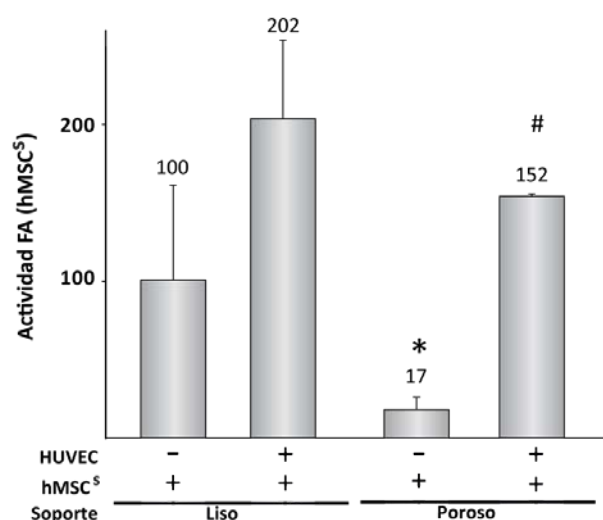


**Figura 31. Viabilidad celular en cocultivos de células HUVEC y hMSC<sup>S</sup>.** Las HUVEC se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación en medio de crecimiento con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre diferentes soportes. La viabilidad de HUVEC y hMSC<sup>S</sup> se determinó inmediatamente antes de establecer los cocultivos (día 0) y tras 3 y 7 días de cultivo. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 0 de cultivo de las hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos (A) o de las HUVEC (B). A este dato se le otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de seis experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas en soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente a día 0; & $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente a un mismo tiempo de cultivo; § $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos a un mismo tiempo de cultivo.



## 6.2. Efecto sobre la actividad FA

A continuación se investigó la influencia de las células HUVEC sobre la maduración osteogénica de células hMSC<sup>s</sup> cultivadas en soportes lisos o porosos. Para ello, se analizó la actividad FA de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos y cocultivadas con HUVEC. Como ya se había observado, la actividad FA en hMSC<sup>s</sup> cultivadas sobre soportes porosos fue menor que cuando se cultivaron sobre soportes lisos (Fig. 32). El cocultivo de células HUVEC con hMSC<sup>s</sup> sembradas en soportes porosos indujo un incremento de la actividad enzimática de unas 9 veces respecto a células cultivadas aisladamente, mientras que en los cocultivos con hMSC<sup>s</sup> sembradas en soportes lisos no se observaron cambios significativos.

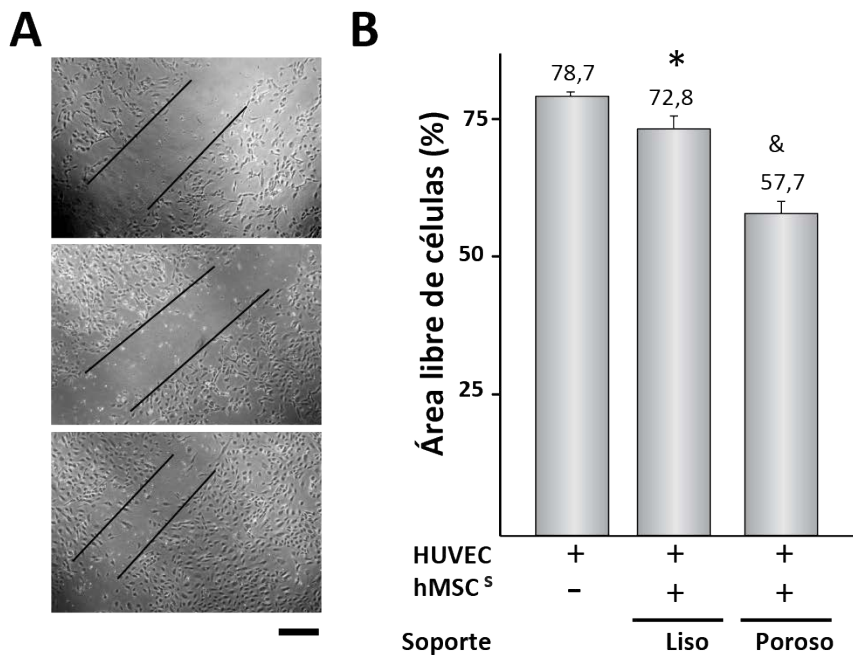


**Figura 32. Actividad FA en cultivos de hMSC<sup>s</sup> y cocultivos de hMSC<sup>s</sup> y células HUVEC.** Las HUVEC se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos. Las células se incubaron durante 7 días en medio de crecimiento y se cuantificó la actividad FA en la capa celular de las hMSC<sup>s</sup>. Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad enzimática de hMSC<sup>s</sup> cultivadas sobre soportes lisos. Este valor fue de  $2,52 \pm 1,51$  nmoles p-nitrofenol/mg proteína/min y se le otorgó un valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de seis experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> cultivadas sobre soportes lisos; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> cultivadas aisladamente sobre soportes porosos.

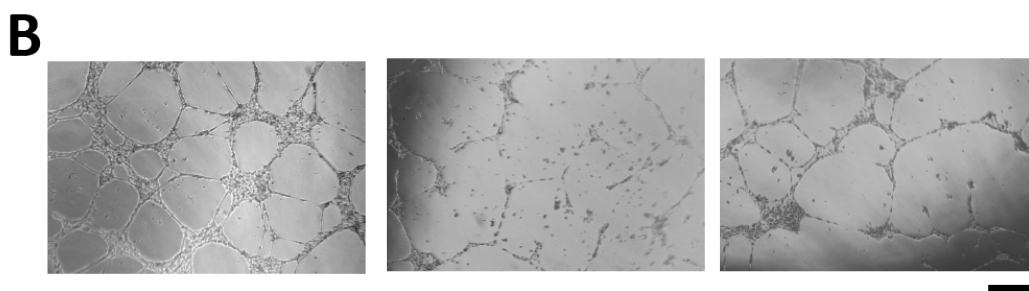
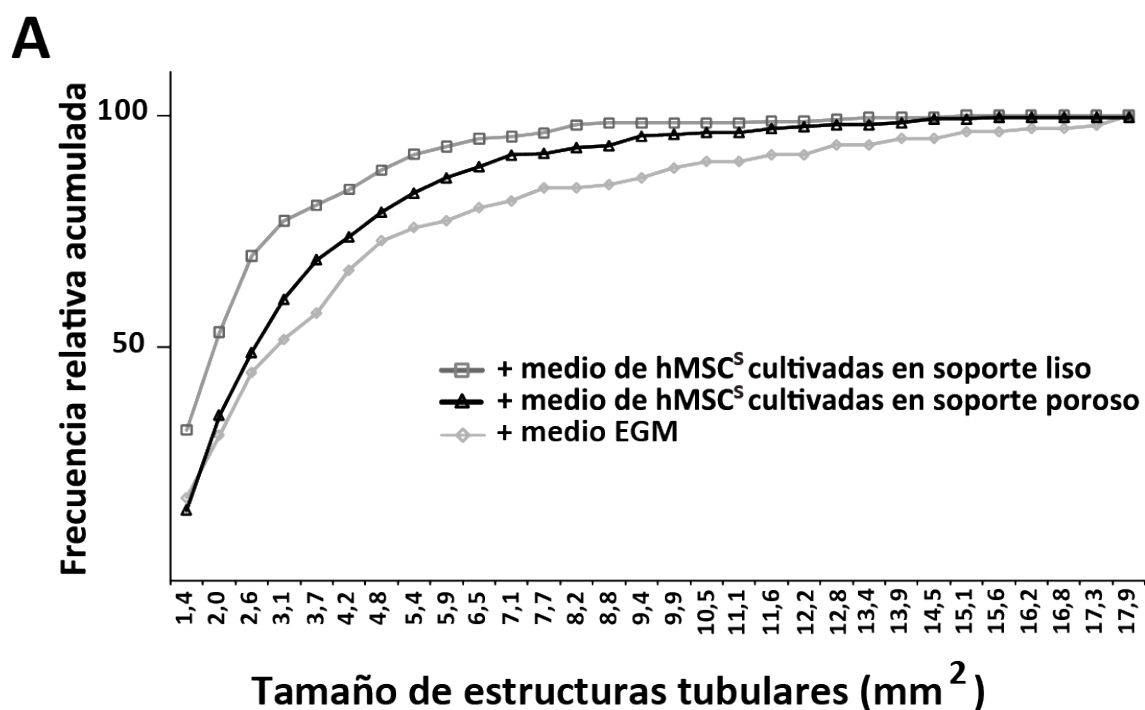
## 6.3. Efecto sobre la migración celular y la formación de estructuras tubulares

A continuación se estudió la influencia de las hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos sobre la migración de las HUVEC. Para ello, se rasgó la monocapa de HUVEC y a continuación se cocultivaron con hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos. El cocultivo permitió una colonización celular más eficiente del área dañada, siendo el área libre de células endoteliales significativamente menor en los cocultivos con hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes porosos que sobre soportes lisos (Fig. 33).

Se estudió asimismo la influencia de la topografía del sustrato en el que se cultivan las hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre la capacidad de las células endoteliales para formar estructuras tubulares. Con este fin, las células HUVEC se cultivaron sobre Matrigel-GFR con medios condicionados procedentes de cultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos o porosos. Como control positivo, se utilizaron células HUVEC cultivadas sobre Matrigel-GFR con medio EGM-2. Los resultados se presentan en un polígono de frecuencia relativa acumulada (Fig. 34). El área del 85 % de las estructuras tubulares formadas por las células HUVEC incubadas en medio EGM-2 es igual o inferior a 8,8 mm<sup>2</sup>. Cuando se incuban con medio procedente de hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes porosos, el 85 % de las estructuras formadas por las células HUVEC presenta un área igual o inferior a 5,4 mm<sup>2</sup>. Si el medio procede de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos, el área correspondiente fue igual o inferior a 4,2 mm<sup>2</sup>. Como cabría esperar, las estructuras tubulares más grandes se generaron en células cultivadas con medio EGM-2, muy rico en distintos factores de crecimiento. Las células HUVEC incubadas con medios procedentes de cultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes porosos formaron estructuras más grandes que aquéllas cultivadas con medios procedentes de hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos.



**Figura 33. Migración de células HUVEC cocultivadas con hMSC<sup>S</sup>.** Las HUVEC se cultivaron hasta confluencia, tras lo que se rasgó la monocapa, cocultivándose a continuación durante 12 h con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos. (A) Imágenes representativas del área libre de células HUVEC cultivadas aisladamente (arriba), cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soporte liso (centro) o con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte poroso (abajo), tras 12 h de incubación. Barra=0,5 mm. (B) Cuantificación del área libre de células HUVEC. Los resultados se expresan como el porcentaje del área libre de células al cabo de 12 h respecto al inicio del cocultivo. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente; & $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso.

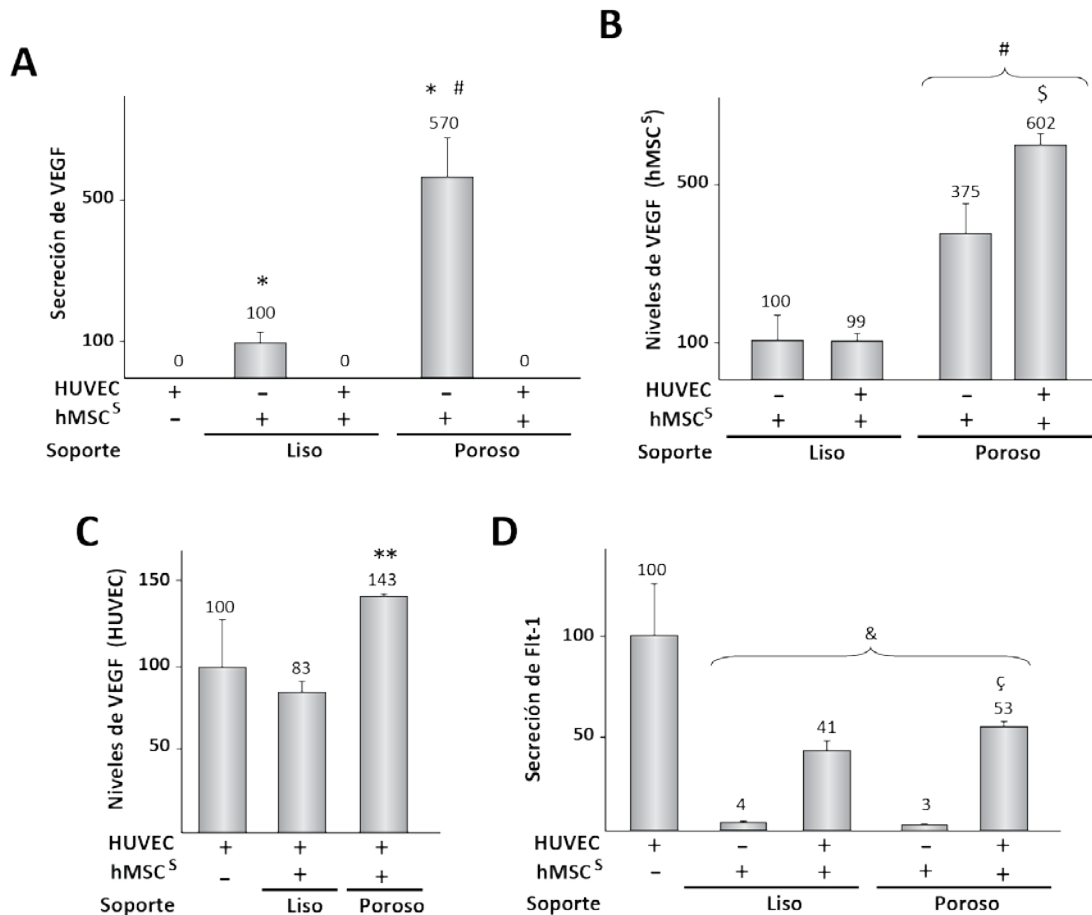


**Figura 34. Formación de túbulos en cultivos de células HUVEC.** (A) Las células HUVEC se cultivaron en Matrigel-GFR con medio EGM-2, con medio procedente de cultivos de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soporte liso o con medio procedente de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soporte poroso. Tras 18 h, se cuantificó el área de las estructuras tubulares formadas. Los resultados de un experimento representativo se muestran como un polígono de frecuencia relativa acumulada del área en  $\text{mm}^2$ , en el que, para un valor considerado, se muestra el porcentaje de estructuras que tienen un área igual o menor. (B) Imágenes representativas de HUVEC cultivadas con medio EGM-2 (izquierda), con medio procedente de cultivos de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soporte liso (centro) o con medio procedente de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soporte poroso (derecha). Barra=0,5 mm.

#### 6.4. Efecto sobre la secreción de VEGF y su receptor Flt-1

Tras haber observado que las HUVEC cocultivadas con hMSC<sup>s</sup> en soportes porosos presentan una mayor viabilidad celular, capacidad de migración y formación de estructuras tubulares, se investigó la secreción de VEGF no unido a receptores en cocultivos de células HUVEC y hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos, que se incubaron en medio de crecimiento durante 7 días. Las hMSC<sup>s</sup> cultivadas aisladamente sobre soportes porosos presentaron mayores

niveles de secreción que las hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos (Fig. 35A). Sin embargo, ni en cultivos de células HUVEC ni en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> y HUVEC se pudo detectar secreción de VEGF, independientemente del soporte sobre el que hubieran sido sembradas las hMSC<sup>S</sup>.



**Figura 35. Producción de VEGF y Flt-1 en cultivos de hMSC<sup>S</sup> y cocultivos de células HUVEC y hMSC<sup>S</sup>.** Las HUVEC se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación durante 7 días en medio de crecimiento con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos. (A-C) Cuantificación de los niveles de VEGF en el medio de cultivo (A) o la capa celular de hMSC<sup>S</sup> (B) o HUVEC (C). Los resultados se expresan como el porcentaje de la secreción de VEGF en cultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos (A) o de los niveles de VEGF en la capa celular de hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos (B) o de HUVEC cultivados aisladamente (C). Estos valores fueron de  $11,6 \pm 3,6$  (A),  $2,3 \pm 1,5$  (B) y  $1,3 \pm 0,4$  (C) pg/ml por  $\mu$ g de proteína y se les otorgó un valor arbitrario de 100. (D) Cuantificación de los niveles de Flt-1 en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de la secreción de Flt-1 en cultivos de HUVEC. Este valor fue de  $5,7 \pm 1,5$  ng/ml. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a HUVEC y a cocultivos de hMSC<sup>S</sup> y HUVEC; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos; § $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes porosos, cultivadas aisladamente; \*\* $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso; & $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente; ζ $p < 0,05$  respecto a HUVEC cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos.

Con el fin de determinar si el cocultivo con células HUVEC inhibía la producción de VEGF por parte de las hMSC<sup>S</sup>, se cuantificó la producción de VEGF en la capa celular de hMSC<sup>S</sup> cocultivadas. Las hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos presentaron niveles tres veces menores que las hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes porosos (Fig. 35B). El cocultivo con células HUVEC no inhibió la producción de VEGF en hMSC<sup>S</sup>. Sorprendentemente, mientras que en las hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos el cocultivo con HUVEC no afectó a la producción de VEGF, en las hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes porosos se observó un importante incremento. En las células HUVEC se detectaron niveles muy similares cuando se cultivaron aisladamente o se cocultivaron con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos. Sin embargo, el cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sobre soportes porosos aumentó los niveles de VEGF en la capa de células HUVEC (Fig. 35C).

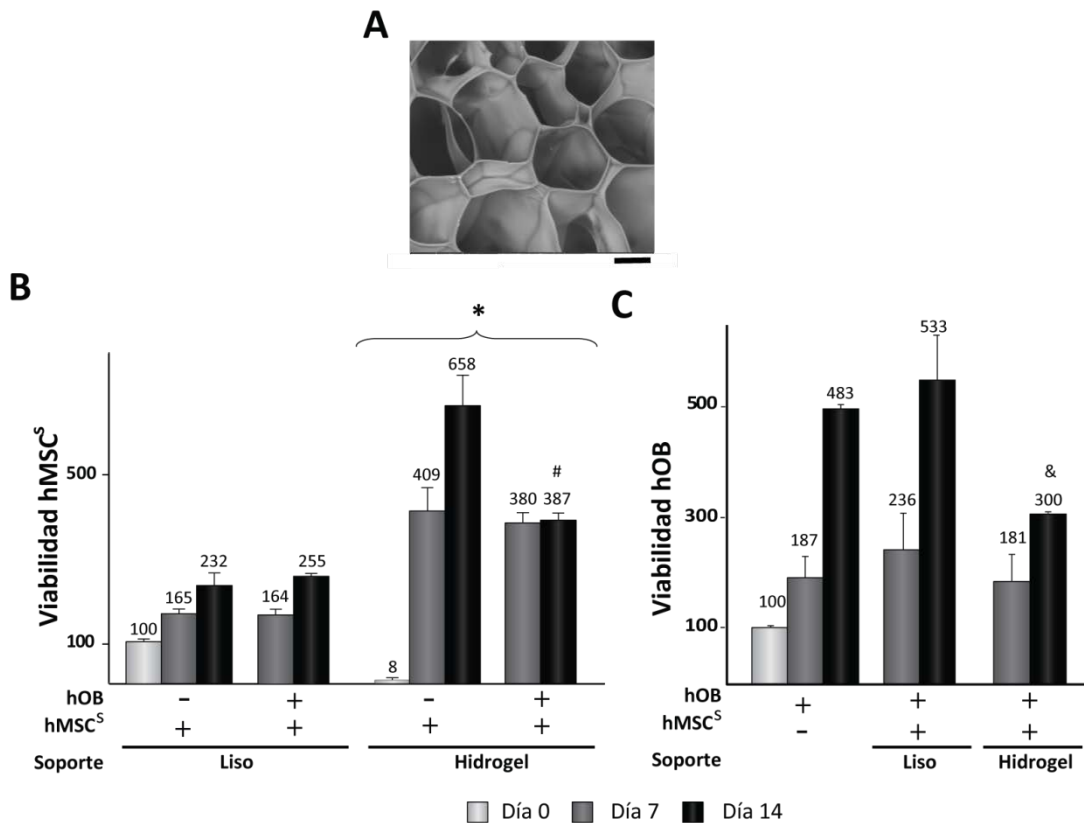
Finalmente, se investigó la secreción del receptor soluble de VEGF, Flt-1, en cocultivos de células HUVEC y hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos, que se incubaron en medio de crecimiento durante 7 días (Fig. 35D). Se observó que la secreción de Flt-1 de las hMSC<sup>S</sup> era mucho menor que la detectada en cultivos de células HUVEC o en cocultivos de HUVEC y hMSC<sup>S</sup>, independientemente del soporte sobre el que hubieran sido sembradas ( $p < 0,05$ ). En comparación con las células HUVEC cultivadas aisladamente, los niveles de Flt-1 detectados en los cocultivos fueron menores, especialmente en los cocultivos de HUVEC y hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos.

## **7. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE hMSC<sup>S</sup> CULTIVADAS EN HIDROGELES DE FIBRINA SOBRE OSTEÓBLASTOS, CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y CÉLULAS ENDOTELIALES**

Una vez explorado el efecto que tiene la topografía del soporte sobre el que se cultivan las hMSC sobre el comportamiento de hOB, hMSC o HUVEC, nos propusimos investigar la influencia de hMSC sembradas en hidrogeles de fibrina, denominadas de forma análoga al apartado anterior hMSC<sup>S</sup>, sobre estos tipos celulares. Para ello, se establecieron cocultivos en los que los diferentes tipos celulares fueron incubados, en ausencia de contacto directo, con hidrogeles conteniendo hMSC<sup>S</sup>. Como control, se emplearon hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos de poliéster. En la Fig. 36A se muestra una imagen de la estructura altamente porosa del hidrogel de fibrina, obtenida mediante SEM, en la que aprecia la existencia de poros de 10 a 30  $\mu\text{M}$ .

### 7.1. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas en hidrogeles de fibrina y hOB

En primer lugar se analizó el efecto del cultivo en hidrogeles sobre la viabilidad de hMSC<sup>S</sup> (Fig. 36B). En el momento de establecer los cocultivos, la actividad metabólica de las hMSC<sup>S</sup> fue acusadamente menor en los hidrogeles que en los soportes lisos. Sin embargo, tras 7 y 14 días de cultivo, la viabilidad de las hMSC<sup>S</sup> contenidas en los hidrogeles aumentó de manera notable, siendo considerablemente mayor que la de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos.

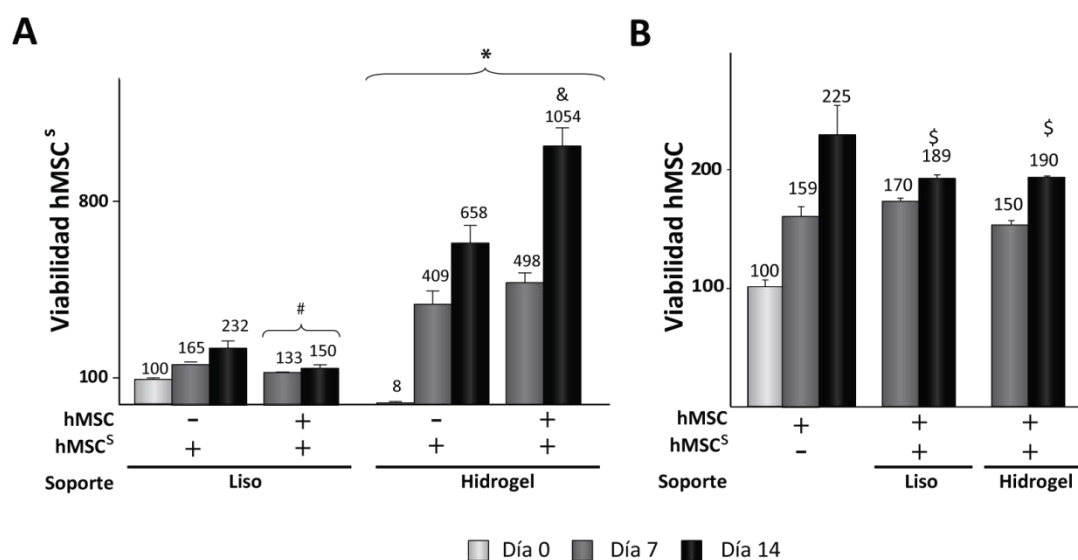


**Figura 36. Viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos o hidrogeles y hOB.** (A) Imagen tomada mediante SEM un hidrogel de fibrina. Barra = 7,5  $\mu$ m. (B-C) Los hOB se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación en medio de crecimiento con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o en hidrogeles. La viabilidad celular de hMSC<sup>S</sup> y hOB se determinó inmediatamente antes de establecer los cocultivos (día 0) y tras 7 y 14 días. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 0 de incubación de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos (B) o de hOB cultivados aisladamente (C). A estos datos se les otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas en soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas aisladamente en hidrogel durante 14 días; & $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente o a hOB cocultivados con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso durante 14 días.

A continuación se evaluó el efecto del cocultivo con hOB. Mientras que el cocultivo con hOB no afectó la actividad metabólica de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre los soportes lisos, observamos un profundo efecto sobre las hMSC<sup>s</sup> incubadas en hidrogeles, cuya actividad metabólica tras 7 días de incubación fue similar que la de las hMSC<sup>s</sup> cultivadas aisladamente pero no experimentó apenas variación durante la posterior incubación. En cuanto al efecto de hMSC<sup>s</sup> sembradas en hidrogeles sobre la viabilidad de hOB, no detectamos diferencias significativas entre cultivos aislados o cocultivos tras 7 días de incubación (Fig. 36C). Cuando ésta se prolongó a 14 días, los hOB cocultivados con hMSC<sup>s</sup> sembradas en hidrogeles mostraron una actividad metabólica significativamente menor que aquéllos cultivados aisladamente o cocultivados con hMSC<sup>s</sup> sembradas en soportes lisos.

## 7.2. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>s</sup> sembradas en hidrogeles de fibrina y hMSC

A continuación, se estudió el efecto de hMSC<sup>s</sup> sembradas en soportes lisos o hidrogeles, sobre hMSC cocultivadas. Como se muestra en la Fig. 37A, tras 14 días de cocultivo con hMSC se observó un fuerte incremento en la viabilidad de hMSC<sup>s</sup> contenidas en hidrogeles, mientras que las hMSC<sup>s</sup> cultivadas sobre soportes lisos sufrieron un descenso en su viabilidad.

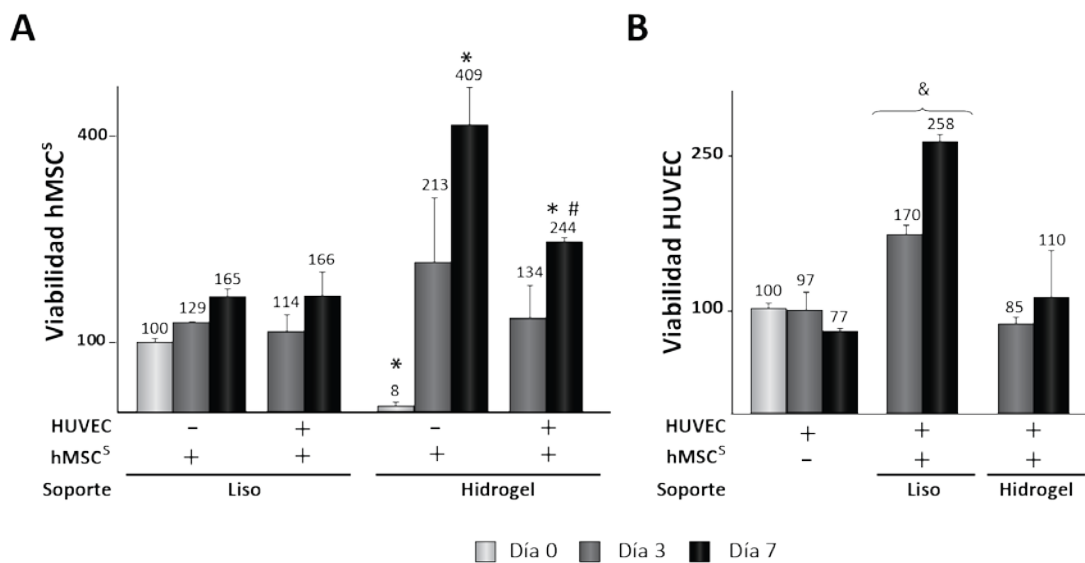


**Figura 37. Viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>s</sup> sembradas en soportes lisos o hidrogeles y hMSC.** Las hMSC se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación en medio de crecimiento con hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos o en hidrogeles. La viabilidad celular se determinó inmediatamente antes de establecer los cocultivos (día 0) y tras 7 y 14 días. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 0 de incubación de hMSC<sup>s</sup> sembradas sobre soportes lisos (A) o de hMSC cultivadas aisladamente (B). A estos datos se les otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> cultivadas en soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> cultivadas aisladamente en soporte liso, a cada tiempo experimental; & $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>s</sup> contenidas en hidrogeles cultivadas aisladamente durante 14 días; \$ $p < 0,05$  respecto a hMSC cultivadas aisladamente durante 14 días.

Al estudiar el efecto que las hMSC<sup>S</sup> contenidas en hidrogeles ejercen sobre la viabilidad de hMSC cocultivadas, se observa una ligera disminución en la viabilidad de estas últimas tras 14 días de incubación, similar al detectado cuando se cocultivan con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos (Fig. 37B).

### 7.3. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas en hidrogeles de fibrina y HUVEC

En primer lugar se evaluó el efecto del cocultivo con HUVEC sobre la viabilidad de hMSC<sup>S</sup> incubadas en hidrogeles. Como muestra la Fig. 38A, el cocultivo durante 14 días disminuyó significativamente la actividad metabólica de las hMSC<sup>S</sup> contenidas en los hidrogeles. En cuanto a la viabilidad de las células endoteliales, ésta no se vio afectada por el cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas en hidrogeles mientras que, en concordancia a lo previamente observado, experimentó un fuerte incremento cuando el cocultivo se efectuó con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos (Fig. 38B).

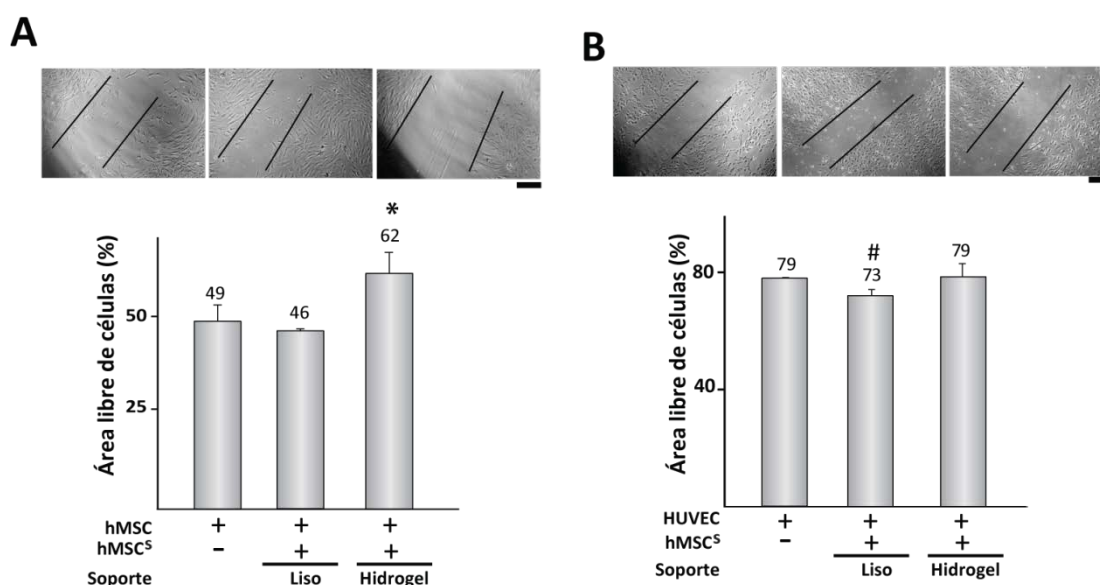


**Figura 38. Viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos o hidrogeles y HUVEC.** Las HUVEC se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación en medio de crecimiento con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o en hidrogeles. La viabilidad celular se determinó inmediatamente antes de establecer los cocultivos (día 0) y tras 3 y 7 días. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 0 de incubación de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos (A) o de HUVEC cultivadas aisladamente (B). A estos datos se les otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas en soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas aisladamente en hidrogel durante 14 días; & $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en hidrogel a un mismo tiempo de cultivo.



#### 7.4. Efecto de hMSC<sup>S</sup> sembradas en hidrogeles de fibrina sobre la migración de hMSC y HUVEC

Finalmente, se estudió el efecto de las hMSC<sup>S</sup> incubadas en hidrogeles sobre la migración de hMSC (Fig. 39A) y HUVEC (Fig. 39B). Se observó que la capacidad de migración de hMSC cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en hidrogeles se reducía significativamente en relación a la de hMSC cultivadas aisladamente o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso. El cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas en hidrogeles no tuvo efecto alguno sobre la migración de células endoteliales mientras que, en concordancia con lo previamente observado, el cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso aumentó ligeramente su capacidad de migración.



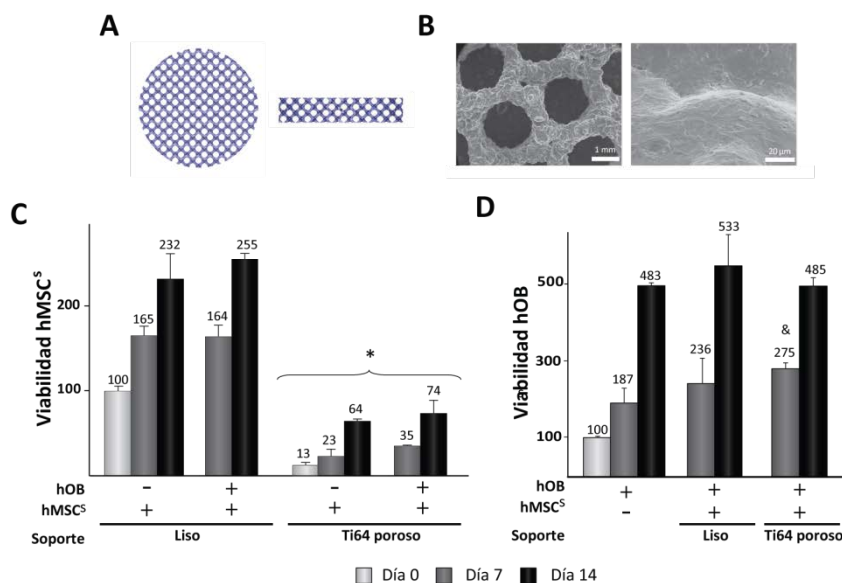
**Figura 39. Migración de hMSC y HUVEC cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en hidrogel.** (A) Las hMSC se cultivaron hasta confluencia, tras lo que se rasgó la monocapa, cocultivándose a continuación durante 48 h con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o en hidrogeles. El panel superior muestra imágenes representativas del área libre de hMSC cultivadas aisladamente (izquierda), cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soporte liso (centro) o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en hidrogel (derecha). Barra=0,5 mm. El gráfico en el panel inferior muestra la cuantificación del área libre de células hMSC. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje del área libre de células al cabo de 48 h, respecto al inicio del cultivo. (B) Las células HUVEC se cultivaron hasta confluencia, tras lo que se rasgó la monocapa, cocultivándose a continuación durante 12 h con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o en hidrogeles. El panel superior muestra imágenes representativas del área libre de células HUVEC cultivadas aisladamente (izquierda), cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso (centro) o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en hidrogel (derecha). Barra=0,5 mm. El gráfico en el panel inferior muestra la cuantificación del área libre de HUVEC. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje del área libre de células al cabo de 12 h, respecto al inicio del cultivo. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a las otras condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente.

## 8. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE hMSC<sup>S</sup> CULTIVADAS EN Ti64 POROSO SOBRE OSTEÓBLASTOS, CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y CÉLULAS ENDOTELIALES

En este apartado se presentan los resultados relativos al estudio de la respuesta de hOB, hMSC y HUVEC cuando son cocultivados, en ausencia de contacto directo, con hMSC sembradas sobre Ti64 poroso, denominadas hMSC<sup>S</sup>. En la Fig. 40A se muestra una representación de la estructura porosa de este material así como imágenes de su aspecto superficial, obtenidas mediante SEM (Fig. 40B). Como control, se emplearon hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos de poliéster.

### 8.1. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso y hOB

En primer lugar se analizó el efecto del cultivo en Ti64 poroso sobre la viabilidad de las hMSC<sup>S</sup>. La baja actividad metabólica de las hMSC<sup>S</sup> al inicio del experimento sugiere que se adhieren en menor medida a los soportes porosos de Ti64 que a los soportes lisos, pero el incremento que se detectó a lo largo del periodo de observación fue muy superior al de las hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos (Fig. 40C).

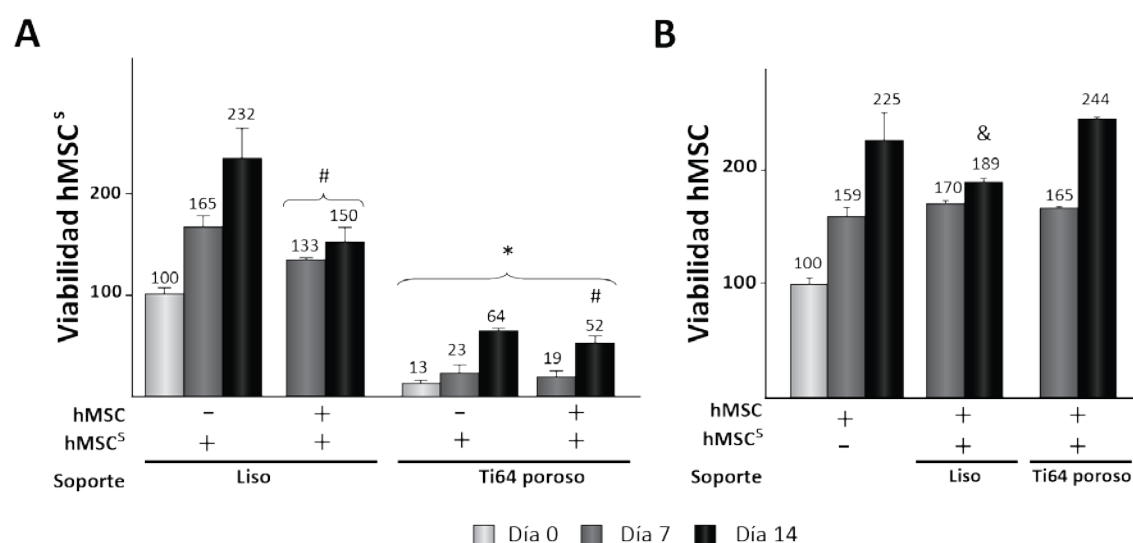


**Figura 40. Viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos o Ti64 poroso y hOB.** (A) Representación de la estructura porosa de los soportes de Ti64, en vista superior (izquierda) y vista lateral (derecha). (B) Imágenes tomadas mediante SEM de los soportes porosos de Ti64. Barra derecha=1 mm. Barra izquierda=20 µm. (C-D) Los hOB se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación en medio de crecimiento con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o Ti64 poroso. La viabilidad celular se determinó inmediatamente antes de establecer los cocultivos (día 0) y tras 7 y 14 días. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 0 de incubación de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos (C) o de hOB cultivados aisladamente (D). A estos datos se les otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras, ± DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas en soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; & $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente.

De forma similar a lo observado previamente con los soportes porosos de poliestireno, el cocultivo con hOB no alteró la viabilidad de las hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 poroso. En cuanto a los hOB cocultivados, se observó un ligero, pero transitorio, aumento de su viabilidad tras ser cocultivados durante 7 días con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 poroso (Fig. 40D).

## 8.2. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso y hMSC

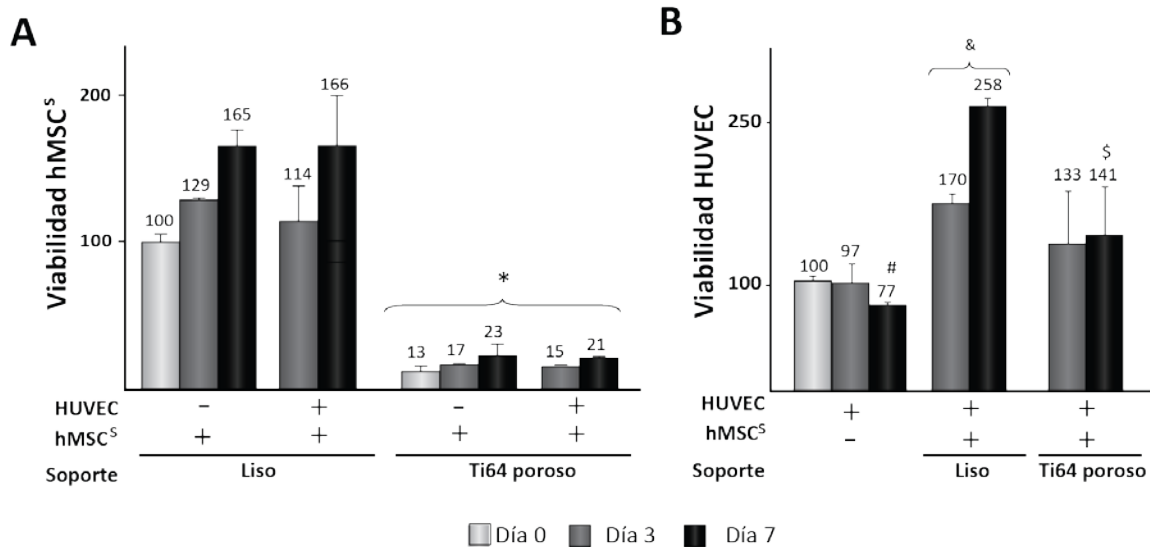
Se estudió el efecto de hMSC<sup>S</sup> incubadas en soportes lisos o Ti64 poroso sobre hMSC cocultivadas. El cocultivo con hMSC disminuyó la viabilidad de las hMSC<sup>S</sup> sembradas tanto en soportes lisos como en Ti64 poroso, aunque la disminución fue más notable en hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre los soportes lisos (Fig. 41A). Las hMSC cocultivadas con células sembradas en soportes lisos mostraron una actividad metabólica más baja que las cultivadas de forma aislada mientras que el cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes porosos de Ti64 no tuvo efecto (Fig. 41B).



**Figura 41. Viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos y Ti64 poroso y hMSC.** Las hMSC se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación en medio de crecimiento con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o Ti64 poroso. La viabilidad celular se determinó inmediatamente antes de establecer los cocultivos (día 0) y tras 7 y 14 días. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 0 de incubación de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos (A) o de hMSC cultivadas aisladamente (B). A estos datos se les otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas en soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas aisladamente para la misma condición experimental; & $p < 0,05$  respecto a hMSC cultivadas aisladamente o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso durante 14 días.

### 8.3. Efecto sobre la viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso y HUVEC

El cocultivo con HUVEC no tuvo efecto alguno sobre la viabilidad de células hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soporte liso o Ti64 poroso (Fig. 42A). La actividad metabólica de las HUVEC aumentó tras ser cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> en soportes lisos (Fig. 42B). Sin embargo, este efecto únicamente se observó al cabo de 7 días de cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes de Ti64 poroso, siendo el incremento en la viabilidad menor que cuando el cocultivo se realizó con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos.

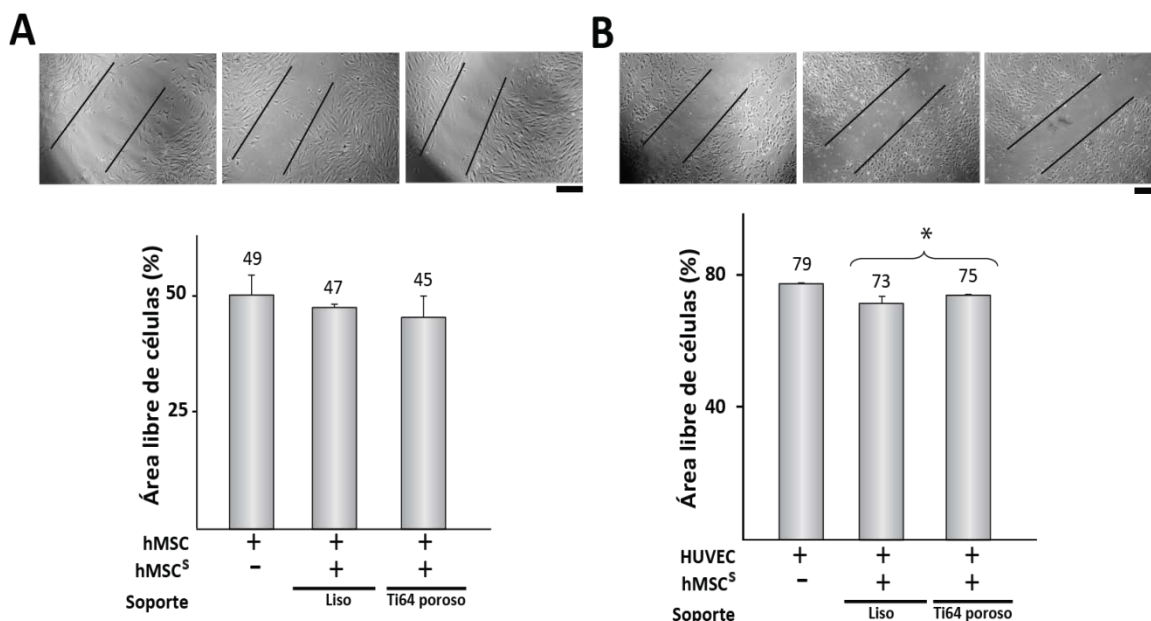


**Figura 42. Viabilidad celular en cocultivos de hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos y Ti64 poroso y HUVEC.** Las HUVEC se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación en medio de crecimiento con hMSC<sup>S</sup> sobre soportes lisos o Ti64 poroso. La viabilidad celular se determinó inmediatamente antes de establecer los cocultivos (día 0) y tras 3 y 7 días. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 0 de incubación de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes lisos (A) o de HUVEC cultivadas aisladamente (B). A estos datos se les otorgó el valor arbitrario de 100. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas en soporte liso bajo las mismas condiciones experimentales; # $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente a día 0; & $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente bajo las mismas condiciones experimentales; § $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soportes lisos durante 7 días.

### 8.4. Efecto de hMSC<sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso sobre la migración celular de hMSC y HUVEC

Por último, se estudió la influencia de hMSC<sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso sobre la migración de hMSC (Fig. 43A) y HUVEC (Fig. 43B). No se observó efecto alguno en la migración de células hMSC, siendo el área libre de células similar tanto en cultivos aislados como en cocultivos, independientemente del soporte sobre el que se hubieran sembrado las hMSC<sup>S</sup>. El efecto de

hMSC<sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso sobre la migración de HUVEC fue similar al ejercido por hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soporte liso, siendo el área libre de células tras 12 h de cultivo ligeramente menor que en HUVEC cultivadas aisladamente.



**Figura 43. Migración de hMSC<sup>S</sup> y HUVEC cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso.** (A) Las hMSC se cultivaron hasta confluencia, tras lo que se rasgó la monocapa, cocultivándose a continuación durante 48 h con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o Ti64 poroso. El panel superior muestra imágenes representativas del área libre de hMSC cultivadas aisladamente (izquierda), cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> incubadas en soporte liso (centro) o hMSC<sup>S</sup> en Ti64 poroso (derecha). Barra=0,5 mm. El gráfico en el panel inferior muestra la cuantificación del área libre de células hMSC. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje del área libre de células al cabo de 48 h, respecto al inicio del cultivo. (B) Las células HUVEC se cultivaron hasta confluencia, tras lo que se rasgó la monocapa, cocultivándose a continuación durante 12 h con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o Ti64 poroso. El panel superior muestra imágenes representativas del área libre de células HUVEC cultivadas aisladamente (izquierda), cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en soporte liso (centro) o cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas en Ti64 poroso (derecha). Barra=0,5 mm. El gráfico en el panel inferior muestra la cuantificación del área libre de HUVEC. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje del área libre de células al cabo de 12 h, respecto al inicio del cultivo. Se representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a HUVEC cultivadas aisladamente.

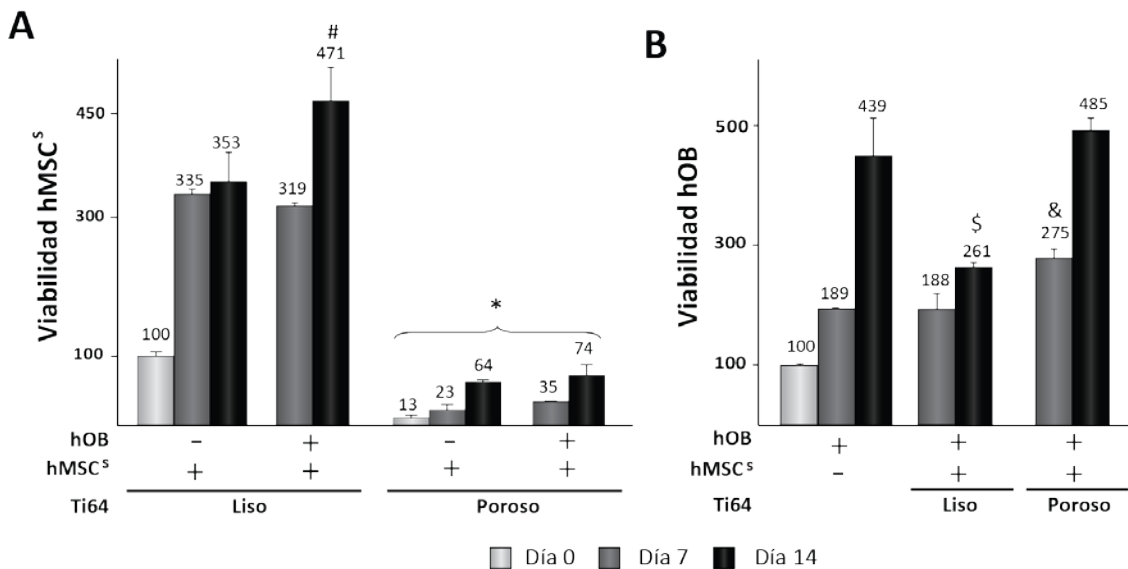
### 8.5. Efecto de hMSC<sup>S</sup> cultivadas en Ti64 poroso o liso sobre el comportamiento de hOB

Finalmente, investigamos si la topografía de la aleación Ti64 en la que se cultivan las hMSC<sup>S</sup> modula la actividad paracrina que estas células ejercen sobre los hOB. Para ello, cocultivamos hOB con hMSC<sup>S</sup> sembradas en Ti64 liso o poroso, en ausencia de contacto directo.

#### 8.5.1. Efecto sobre la viabilidad celular

En primer lugar, se analizó el efecto del cocultivo sobre la viabilidad de células hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 liso o poroso. Las hMSC<sup>S</sup> se adhirieron en menor medida al Ti64 poroso

que al Ti64 liso. Sin embargo, su actividad metabólica incrementó a una tasa superior a la de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre Ti64 liso (Fig. 44A). El cocultivo con hOB durante 14 días aumentó la viabilidad de las hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre Ti64 liso mientras que no afectó a la de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre Ti64 poroso, como habíamos observado previamente. También en concordancia con los datos anteriores, se observó un ligero aumento en la viabilidad de hOB cocultivos con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 poroso tras 7 días de cultivo mientras que no se observaron cambios en la de los hOB cocultivos con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos (Fig. 44B). La actividad metabólica de los hOB cocultivos sobre Ti64 liso sufrió un modesto incremento al prolongar la incubación durante 14 días, siendo marcadamente inferior que la de los hOB cultivados aisladamente o cocultivos con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 poroso.

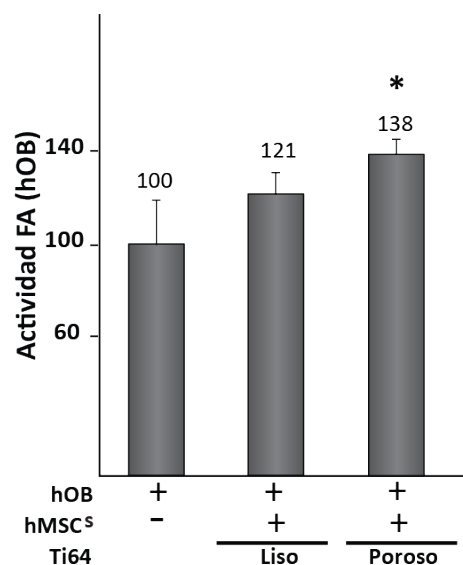


**Figura 44. Viabilidad celular en cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 liso o poroso.** Los hOB se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación en medio de crecimiento con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 liso o poroso. La viabilidad celular se determinó inmediatamente antes de establecer los cocultivos (día 0) y tras 7 y 14 días. Los resultados se expresan como el porcentaje de la fluorescencia correspondiente al día 0 de incubación de hMSC<sup>S</sup> cultivadas sobre soportes Ti64 lisos (A) o de hOB cultivados aisladamente (B). A estos datos se les otorgó el valor arbitrario de 100. Cada valor, indicado numéricamente encima de las barras, representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> cultivadas en soporte Ti64 liso bajo las mismas condiciones experimentales; <sup>#</sup> $p < 0,05$  respecto a hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 liso y cultivadas aisladamente; <sup>\$</sup> $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente o cocultivos con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 poroso durante 14 días; <sup>&</sup> $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente o cocultivos con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 liso durante 7 días.

### 8.5.2. Efecto sobre la actividad FA

Se comparó el efecto sobre la actividad FA de hOB del cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas en Ti64 liso o Ti64 poroso. Como muestra la Fig. 45, la actividad FA de los hOB no se vio afectada por el cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 liso. De manera similar a lo observado en cocultivos

de hOB con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes porosos de poliestireno (Fig. 21C), el cocultivo con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 poroso aumentó significativamente la actividad FA de los hOB.



**Figura 45. Actividad FA en cocultivos de hOB y hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre Ti64 liso o poroso.** Los hOB se cultivaron de forma aislada durante 24 h, cocultivándose (+) o no (-) a continuación con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos. Las células se incubaron durante 14 días en medio osteogénico y se cuantificó la actividad FA en la capa celular. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de la actividad enzimática de hOB. Este valor fue de  $16 \pm 6,2$  nmoles p-nitrofenol/mg proteína/min y se le otorgó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media, indicada numéricamente encima de las barras,  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a hOB cultivados aisladamente.





***DISCUSIÓN***



## 1. COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS SOBRE LA ALEACIÓN Ti64 MODIFICADA MEDIANTE LP

El tratamiento de la aleación Ti64 mediante LP genera una capa superficial de óxido que contiene  $\text{TiO}$  metaestable y que en su zona más externa presenta, además de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  e hidróxido de aluminio. Cabe destacar que el aumento del número de pulsos en el tratamiento LP2 da lugar a la aparición de un pequeño porcentaje de rutilo. Estudios previos indican que los tratamientos térmicos de la aleación que generan una capa de óxido superficial modulan el comportamiento de células del linaje osteoblástico. Por ejemplo, su calentamiento a 500-700 °C durante 1 h en horno al aire, da lugar a la generación de una capa superficial de rutilo que acelera la adhesión de osteoblastos (García-Alonso, 2003; Saldaña, 2005; Saldaña, 2007). Sin embargo, hemos observado que el tratamiento con LP no altera la tasa de adhesión de osteoblastos ni de células madre mesenquimales a la aleación. El proceso de adhesión celular a cualquier material está modulado no sólo por las características químicas de su superficie sino también por las topográficas. Por ejemplo, el tratamiento de la aleación mediante arenado con partículas micrométricas de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  genera superficies altamente deformadas que ralentizan la adhesión de los osteoblastos (Saldaña, 2007). El tratamiento térmico de la aleación arenada, mediante calentamiento al aire en horno, oxida la superficie generando una capa de  $\text{TiO}_2$  a la que los osteoblastos se adhieren con una tasa similar a la detectada en la aleación pulida sin tratar, a pesar de que la rugosidad de la aleación no experimenta cambios significativos (Saldaña, 2007). Las aleaciones tratadas mediante LP presentan superficies deformadas en un rango de rugosidad submicrométrico que podrían dificultar el proceso de adhesión. Cabe especular que el efecto deletéreo que impone el cambio topográfico de la superficie se compense a través de la generación de una capa oxidada que favorece la interacción con las células, resultando en una tasa de adhesión similar a la que se detecta en la aleación no tratada.

Tanto las células madre mesenquimales como los osteoblastos cultivados durante un breve periodo de 4 h sobre las aleaciones tratadas mediante LP presentan una morfología alargada, con múltiples filopodios, protrusiones citoplásmicas y lamelipodios de gran tamaño que se siguieron observando en las fases más posteriores de la adhesión al material. Estas estructuras, probablemente relacionadas con la reorganización de la arquitectura celular impuesta por las crestas y valles de las superficies tratadas, también han sido descritas en fibroblastos cultivados sobre superficies de titanio oxidadas anódicamente que presentan cambios en la topografía, similares a los observados en las aleaciones tratadas (Guida, 2013). A pesar de su diferente morfología, las células cultivadas en la aleación Ti64 sin tratar o en las muestras oxidadas mediante LP no presentaron diferencias significativas en el área celular.

Saldaña y col. (2007) observaron que el proceso de arenado induce una disminución en el área celular de osteoblastos cultivados en superficies de Ti64. De forma similar a lo observado en las muestras tratadas mediante LP, esta diferencia dejó de ser apreciable cuando la aleación arenada se trató térmicamente.

El estudio de la implicación del calcio en el proceso de adhesión a la aleación tratada mediante LP indica una mayor dependencia de este elemento por parte de las hMSC cultivadas sobre Ti64 LP1 y especialmente sobre Ti64 LP2, que sobre la aleación pulida. Las integrinas, implicadas en las adhesiones célula-ECM, son moléculas dependientes de calcio (Rowin, 1998; Yamodo, 2012), por lo que es posible que los cambios superficiales provocados en la aleación tras el tratamiento mediante LP afecten al número y/o a la calidad de las adhesiones mediadas por integrinas. La correlación entre las características superficiales de los materiales y la adhesión mediada por integrinas ha sido ampliamente descrita en la literatura. Por ejemplo, se ha observado un incremento transitorio en la expresión de la integrina  $\beta 1$  en hOB cultivados sobre la aleación Ti64 pulida y oxidada térmicamente (Saldaña, 2005). Asimismo, se ha descrito un aumento en la expresión a nivel de ARNm de la integrina  $\beta 1$  en MSC de rata cultivadas sobre superficies de titanio con rugosidad submicrométrica, generadas mediante tratamiento con ácido y peróxido de hidrógeno que conduce a la formación de una capa de rutilo y anatasa (Zhang, 2013). Aunque en este estudio no se han investigado cambios en la expresión de las integrinas, nuestros datos sugieren que las células madre mesenquimales, pero no los osteoblastos, experimentan una modulación negativa de las adhesiones mediadas por estas moléculas en superficies tratadas mediante LP. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha detectado previamente importantes diferencias entre los comportamientos adhesivos de células madre mesenquimales y osteoblastos a modificaciones topográficas de la aleación Ti64 (Calzado-Martín, 2014).

Dado que las adhesiones focales son estructuras que conectan el ambiente extracelular con el citoesqueleto de actina y moléculas señalizadoras, se investigó su formación en hMSC y hOB adheridos a la aleación tratada mediante LP. En las adhesiones de ambos tipos celulares cultivados sobre las aleaciones tratadas, la colocalización de la molécula adaptadora paxilina con las fibras de actina, claramente observable en células cultivadas sobre Ti64 sin tratar, fue muy minoritaria. Además, la señal correspondiente a paxilina presentó una menor longitud en las células que interaccionan con la aleación tratada. La disminución del tamaño de las adhesiones focales ha sido previamente relacionada con el incremento de la rugosidad superficial del material. Así, se ha postulado que las fibras de fibronectina en superficies deformadas adoptan conformaciones menos favorables para su interacción con las integrinas (Lüthen, 2004). La distancia de los motivos de unión a integrinas de las proteínas de

la ECM, determinante en la formación de adhesiones focales (Cavalcanti-Adam, 2007), también podría estar afectada en superficies tratadas mediante LP. Mientras que FAK fosforilada en el residuo 397 colocaliza con las fibras de actina en los sitios de adhesión de hMSC y hOB a la aleación sin tratar, esta distribución se observó en mucha menor medida en las adhesiones que se establecen con las aleaciones tratadas. Además, en células cultivadas sobre éstas se detectó un importante descenso de los niveles intracelulares de p-FAK Y397. Por otro lado, se observó que la forma de FAK fosforilada en 407, que se relaciona con una disminución de la actividad quinasa de la molécula (Lim, 2007a), colocaliza con actina de forma similar en las adhesiones de células cultivadas sobre la aleación tratada o sin tratar. Curiosamente, los datos existentes en la literatura señalan que las superficies deformadas estimulan los niveles intracelulares de la forma de FAK fosforilada en el residuo 397. Por ejemplo, la expresión de p-FAK Y397 en osteoblastos fetales es mayor cuando se cultivan sobre sustratos nanoestructurados de ácido poliláctico que sobre el sustrato liso (Lim, 2007b). También en superficies de acero 316 LVM se ha detectado un incremento en los niveles intracelulares de p-FAK Y397 (Saldaña, 2014). Datos de nuestro laboratorio indican un incremento en la expresión de p-FAK Y397 así como acumulación de la molécula en los sitios de adhesión celular en osteoblastos cultivados sobre la aleación Ti64 oxidada mediante tratamiento en horno a 500 o 700 °C durante 1 h (Saldaña, 2005). Tanto por el incremento en la rugosidad como por la oxidación de la superficie que conlleva el tratamiento de la aleación mediante LP, hubiera sido esperable que las células hMSC y hOB estableciesen adhesiones mediadas por p-FAK Y397. Numerosos estudios indican que la actividad y fosforilación de FAK condiciona la capacidad de migración y proliferación celular (Gilmore, 1996; Schlaepfer, 2004). A pesar de los profundos cambios detectados en la expresión y localización de p-FAK Y397 en los sitios de adhesión, la viabilidad y capacidad de ensamblaje de una matriz de fibronectina de células adheridas a las aleaciones tratadas mediante LP y a la aleación no tratada fueron similares. En este sentido, diversos estudios sugieren que, en ausencia de FAK, otras moléculas pueden actuar como transductoras de las señales de adhesión. ILK es una quinasa que comunica las integrinas con el citoesqueleto de actina y moléculas señalizadoras como la GTPasa Rho (Ghatak, 2013). Participa en la detección de cambios topográficos y en la posterior señalización y modulación del comportamiento celular. Así, células osteoblásticas cultivadas sobre topografías micro y nanométricas de titanio presentan un aumento en la expresión de ILK que se ha relacionado con un incremento en la expresión de marcadores de fenotipo osteoblástico (Wang, 2013). Pyk2, una quinasa rica en prolina perteneciente a la familia de las quinasas de adhesión focal, presenta un efecto compensatorio de la actividad de FAK. Por ejemplo, células de cáncer de mama de ratón en las que se inhibió la expresión de FAK

incrementan la expresión de Pyk2 de forma que su capacidad de migración y proliferación es similar a la de células con niveles normales de FAK (Fan, 2011). Mediante ensayos de inmunofluorescencia empleando anticuerpos específicos, nos propusimos estudiar si Pyk2 e ILK estaban implicados en la adhesión a las aleaciones tratadas mediante LP. La señal de Pyk2 no pudo ser detectada ni en hMSC ni en hOB y no fue posible detectar señal específica de ILK en las adhesiones de células cultivadas sobre las aleaciones (datos no mostrados). Finalmente, cabe mencionar que el silenciamiento de FAK en fibroblastos no reduce su adhesión a superficies de titanio lisas ni deformadas mediante tratamiento de arenado (Oates, 2011). Las adhesiones focales de estos fibroblastos son ricas en cortactina, una proteína implicada en la estabilidad del citoesqueleto de actina y en la formación de lamelipodios, y que quizás pudiera estar participando en el proceso de adhesión a las aleaciones tratadas mediante LP.

La proliferación y ensamblaje de matriz extracelular están modulados no sólo por las características químicas de la superficie del material sino también por sus características topográficas. En general, las superficies deformadas topográficamente disminuyen la tasa de proliferación celular (Saldaña, 2006; Saldaña, 2007; Saldaña, 2014). Por ejemplo, los osteoblastos cultivados sobre superficies arenadas de Ti64 presentan una proliferación y viabilidad menor que sobre Ti64 pulido (Saldaña, 2007). Sin embargo, cuando los osteoblastos se cultivan sobre superficies arenadas y posteriormente oxidadas mediante tratamiento térmico en horno durante 1 h, proliferan a la misma tasa que sobre Ti64 pulido (Saldaña, 2007). De forma similar, la viabilidad de hMSC y hOB cultivados durante una semana sobre las aleaciones Ti64 tratadas mediante LP es similar que sobre la aleación no tratada, probablemente debido a que el efecto detrimental que la deformación topográfica podría ejercer sobre la proliferación celular queda amortiguado por el efecto positivo de la capa de óxido. También las propiedades superficiales de los materiales condicionan la maduración celular y las actividades específicas del fenotipo osteoblástico. Por ejemplo, el incremento de la rugosidad tiende a favorecer la diferenciación osteogénica y la expresión de genes osteoblásticos (Gittens, 2011; Saldaña, 2006; Saldaña, 2007; Saldaña, 2014). Asimismo, se ha observado que los tratamientos de la aleación que conducen a la formación de una capa de óxido superficial estimulan la expresión de genes y actividades osteoblásticas (Saldaña, 2005; Saldaña, 2007; Sugita, 2011). Los datos recogidos en esta memoria indican que las células hMSC maduran hacia el linaje osteoblástico sobre las aleaciones tratadas mediante LP a un nivel incluso superior que sobre la aleación sin tratar, como indica la mayor actividad fosfatasa alcalina y grado de mineralización de la capa de células incubadas en medio osteogénico. En cuanto a los osteoblastos, se detectó que la superficie de las aleaciones tratadas permiten las actividades propias de estas células terminalmente diferenciadas. Su actividad fosfatasa

alcalina fue mayor en las dos aleaciones tratadas que en la aleación sin tratar, mientras que el grado de mineralización no se vio alterado en la aleación Ti64 LP2 e incrementó significativamente en Ti64 LP1. En conjunto, los datos de los que disponemos apuntan a que las funciones osteoblásticas se estimulan en mayor medida sobre la aleación Ti64 LP1 que en Ti64 LP2. Futuras investigaciones nos permitirán dilucidar si estas diferencias son atribuibles a cambios en la química superficial de las dos aleaciones tratadas.

En resumen, los datos presentados en esta memoria indican que la oxidación térmica de la superficie de la aleación Ti64 mediante LP constituye una alternativa a los tratamientos convencionales de oxidación térmica en horno. El procesamiento mediante LP podría ser aplicado localmente en zonas del implante que hayan de osteointegrarse ya que permite la adhesión, proliferación y maduración de células osteoprogenitoras y células formadoras de hueso.

## **2. EFECTO DE LA POROSIDAD DEL MATERIAL EN EL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES**

Con el fin de investigar el efecto de la topografía sobre la que se cultivan las células madre mesenquimales en su comportamiento, utilizamos soportes poliméricos de poliestireno con un 90 % de porosidad y poros de tamaño heterogéneo. Como control de nuestros experimentos empleamos soportes lisos de poliéster en los que la viabilidad de las hMSC es similar a la detectada en plástico de cultivos, de poliestireno. El tamaño de los poros y el grado de porosidad son características importantes en los materiales diseñados para regeneración ósea. Dependiendo del tipo celular examinado y de la composición química del material, el tamaño de poro que promueve una adecuada adhesión celular varía considerablemente. Por ejemplo, soportes de ácido poliláctico con poros con diámetros comprendidos entre 63 y 150  $\mu\text{m}$  favorecen la adhesión de células de la musculatura lisa vascular, mientras que células fibroblásticas se adhieren tanto a poros de 38  $\mu\text{m}$  como de 150  $\mu\text{m}$  (Zeltinger, 2001). Los datos recogidos en esta memoria indican que las hMSC se adhieren en menor medida a los soportes porosos que a los soportes lisos. A pesar de que la adhesión inicial fue menor, la viabilidad de las células aumentó de forma más acusada al cultivarlas sobre soportes porosos que sobre soportes lisos, en concordancia con los datos publicados por Song y col. (2013), quienes observaron un incremento en la proliferación de células madre mesenquimales cultivadas sobre alúmina nonoporosa respecto a su cultivo en sustratos de alúmina lisa. El nivel de producción de colágeno tipo I es considerado un índice del grado de proliferación, ya que éste se produce en las primeras fases de crecimiento de las células del linaje osteoblástico (Lian, 1995). Las células cultivadas sobre los soportes porosos presentaron niveles similares de

secreción de COLI que células cultivadas sobre topografías lisas, indicando que en ambas superficies las células se encuentran en una activa fase de proliferación. En el desarrollo de esta memoria también se investigó el efecto de materiales de potencial uso en ingeniería tisular, como hidrogeles de fibrina o sustratos porosos de Ti64, sobre el comportamiento de las células madre mesenquimales. De forma similar a lo observado en soportes porosos de poliestireno, la actividad metabólica inicial de las células madre mesenquimales sembradas en los hidrogeles o en soportes porosos de Ti64 fue considerablemente menor que en los soportes lisos. Sin embargo, durante el periodo de incubación posterior, la viabilidad de las células experimentó un incremento superior en los diferentes soportes porosos que en los soportes lisos. Este efecto podría estar relacionado con la mayor superficie específica de los materiales porosos, que permiten la proliferación y expansión celular. En este sentido, destaca el acusado incremento de viabilidad observado en hMSC cultivadas en hidrogeles de fibrina, cuya superficie específica es considerablemente mayor que la de los soportes lisos (Janmey, 2009).

La mayoría de los estudios referentes a la topografía o porosidad de soportes para ingeniería tisular ósea se han centrado en investigar su efecto sobre la capacidad de colonización y maduración osteogénica de células madre mesenquimales. Sin embargo, el proceso de regeneración ósea necesariamente requiere de procesos resortivos del hueso adyacente al material implantado, sobre el que posteriormente los osteoblastos formarán nuevo tejido óseo (Cameron, 2013). Curiosamente, la influencia de las propiedades topográficas del material en el proceso resortivo ha sido escasamente explorado. Los datos recogidos en esta memoria indican que las hMSC cultivadas sobre soportes porosos de poliestireno secretan niveles menores de OPG en relación a hMSC cultivadas sobre soportes lisos. Dado que la secreción de RANKLs en ambos soportes es similar, la relación OPG/RANKLs disminuye en los medios de células cultivadas sobre soportes porosos. En nuestros estudios hemos detectado que los niveles basales de actividad FA en células cultivadas sobre soportes porosos son menores que sobre los lisos, lo que sugiere que la porosidad podría contribuir a mantener las células en un estado menos diferenciado. El grado de maduración osteoblástica se correlaciona con la expresión de los genes del sistema OPG/RANKL. Así, cuanto mayor es el grado de diferenciación osteoblástica de células madre estromales, mayor es el nivel de acumulación del ARNm de OPG y menor el de RANKL (Gori, 2000). También la secreción de M-CSF, factor necesario para la maduración de los preosteoclastos, aumenta cuando las hMSC son cultivadas sobre topografías porosas. En conjunto, estos datos indican que la topografía de los soportes porosos que albergan las células madre mesenquimales condiciona la secreción



de factores solubles que favorecen el proceso de resorción ósea en mayor medida que la de los soportes lisos.

### **3. EFECTO DE LA POROSIDAD DEL MATERIAL EN EL QUE SE CULTIVAN LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE LAS RELACIONES PARACRINAS QUE ESTABLECEN CON OSTEÓBLASTOS**

El estudio de la comunicación paracrina que establecen las células madre mesenquimales con otros tipos celulares tras ser sembradas *ex vivo* sobre materiales diseñados para ingeniería tisular permite comprender los procesos subsiguientes a la implantación de un intermediario tisular. Una vez implantado dicho intermediario, las células que alberga serán capaces de modular localmente la actividad de osteoblastos, células endoteliales y de células osteoprogenitoras adyacentes, entre otros tipos celulares. Hasta el momento, son muy escasos los estudios que investigan el efecto de la topografía en la que se han sembrado las células madre mesenquimales en su interacción con otros tipos celulares. Datos recientemente publicados por nuestro grupo de investigación indican que la porosidad del sustrato sobre el que se cultivan las hMSC modula la secreción por parte de estas células de factores paracrinicos que controlan la actividad de células del linaje monocito-macrófago (Vallés, 2015). En esta memoria se recoge el estudio del efecto de la porosidad del material sobre el que se cultivan las hMSC en la relación paracrina que estas células establecen con los hOB.

Estudios previos han detectado que la proliferación de células madre mesenquimales de diferentes fuentes se modifica, incrementando (Birmingham, 2012) o disminuyendo (Proksch, 2012), cuando estas células se cocultivan en ausencia de contacto directo con células osteoblásticas. Bajo nuestras condiciones experimentales, hemos observado que el cocultivo en medio de crecimiento con hOB no afecta a la viabilidad de las hMSC sembradas ni en soportes lisos ni porosos. Un efecto similar fue observado cuando las células se sembraron en soportes porosos de Ti64. Sin embargo, sobre otros materiales, como Ti64 liso o hidrogeles de fibrina, el cocultivo con hOB incrementó o disminuyó, respectivamente, la actividad metabólica de las hMSC. Estudios previos indican que los osteoblastos pueden modular de forma paracrina la maduración osteogénica de células madre mesenquimales. Por ejemplo, el cocultivo indirecto con hOB induce la expresión a nivel de ARNm de FA, sialoproteína ósea u osteocalcina en hMSC (Ilmer, 2009). Nuestros experimentos indican que la actividad FA de hMSC sembradas sobre superficies lisas es ligeramente menor en células cocultivadas con hOB que en células hMSC cultivadas aisladamente cuando son incubadas en medios inductores de la diferenciación osteogénica. La porosidad del sustrato parece jugar un papel relevante en el control que ejercen los osteoblastos sobre las células madre mesenquimales, ya que la

estimulación de la actividad FA en hMSC sembradas sobre soportes porosos fue sustancialmente superior cuando se cocultivaron con hOB. En conjunto, estos datos sugieren que en ausencia de contacto directo los osteoblastos pueden modular la viabilidad y maduración osteogénica de las células madre mesenquimales en función de las características químicas y topográficas del sustrato que las alberga.

Existen escasas referencias en la literatura acerca del efecto de las células madre mesenquimales sobre la viabilidad o proliferación de osteoblastos. De hecho, la mayoría de los estudios relativos a las interacciones que establecen estos tipos celulares se han centrado en investigar el efecto de los osteoblastos sobre el comportamiento de las células madre mesenquimales (Birmingham, 2012; Ilmer, 2009; Proksch, 2012; Tsai, 2012). Nuestras observaciones indican que la viabilidad de los osteoblastos no se altera cuando se cocultivan con células madre mesenquimales sembradas sobre soportes lisos de poliéster o porosos de poliestireno. Sin embargo, detectamos efectos detrimentales en la actividad metabólica de hOB cocultivados con hMSC sembradas sobre sustratos lisos de Ti64 y especialmente con hMSC sembradas en hidrogeles de fibrina. En este sentido, Sun y col. (2012) observaron que la incubación de osteoblastos de rata con medios condicionados procedentes de células madre mesenquimales de rata conduce a una disminución en su proliferación. Curiosamente, cuando los hOB se cocultivaron con hMSC sembradas en soportes porosos de Ti64 su actividad metabólica no solo no sufrió detrimento alguno, sino que tras una semana en cocultivo fue superior a la de hOB cultivados aisladamente. Estos datos sugieren que la implantación de mallas porosas de Ti64 albergando hMSC podría estimular la viabilidad de los osteoblastos residentes en el tejido óseo adyacente.

Quisimos investigar con mayor detalle si la porosidad del soporte sobre el que están sembradas las hMSC tiene alguna influencia sobre la secreción de proteínas de matriz extracelular. Los niveles de FN en cultivos de hOB incubados aisladamente o cocultivados con hMSC sembradas en soportes lisos de poliéster o porosos de poliestireno no sufrieron cambios relevantes. Sin embargo, los niveles de COLI en el medio de cocultivos en los que las hMSC habían sido sembradas en soportes porosos fueron muy superiores a los detectados en cultivos de hOB incubados aisladamente. Este aumento en la secreción se relacionó con una notable acumulación del ARNm del gen *COL1A1* en hOB cocultivados con hMSC sembradas en soportes porosos. El cocultivo con hMSC en medio osteogénico aumentó la actividad FA de los hOB, siendo mayores los niveles alcanzados cuando el cocultivo se realizó con hMSC sembradas sobre soportes porosos. Este incremento en la actividad FA de los hOB se correlacionó con cambios en los niveles de acumulación del ARNm del gen que codifica para esta enzima. De forma similar a lo observado con los soportes porosos de poliestireno,

también la actividad fosfatasa alcalina de los hOB cocultivados con hMSC sembradas sobre soportes porosos de Ti64 fue significativamente mayor que la de hOB cultivados aisladamente. Finalmente, observamos que el cocultivo con hMSC disminuye la capacidad de los hOB para mineralizar la matriz y que únicamente cuando las hMSC están sembradas sobre soportes porosos disminuyen en los hOB los niveles del ARNm del gen que codifica para la osteocalcina. En conjunto, estos datos sugieren que la porosidad del material que alberga las hMSC probablemente juega un papel relevante en el control que estas células ejercen sobre las funciones de las células formadoras de hueso adyacentes al intermediario tisular. Así, cuando las células mesenquimales están sembradas en soportes porosos, estimulan en los osteoblastos la expresión y actividad de genes relacionados con la organización y maduración de la matriz ósea, como el colágeno y la fosfatasa alcalina, mientras que atenúan la expresión de genes relacionados con etapas más tardías de mineralización de dicha matriz, como la osteocalcina (Lian, 1995). Un estudio reciente indica que el cocultivo indirecto de osteoblastos y células madre mesenquimales de tejido adiposo sembradas sobre un soporte poroso cerámico de  $\text{Ca}_3\text{ZrSi}_2\text{O}_9$  denominado “bagdadita” induce en los osteoblastos un aumento en la expresión de genes relacionados tanto con etapas tempranas de la maduración ósea como tardías (Lu, 2014). Sin embargo, este efecto inductor se atenúa en gran medida cuando las hMSC se siembran sobre soportes porosos de hidroxiapatita y fosfato tricálcico. Estos resultados refuerzan la idea de que no sólo la porosidad del sustrato en que están sembradas las células mesenquimales sino también su composición química juega un papel muy importante en el control remoto que estas células pueden ejercer sobre la actividad de los osteoblastos.

Finalmente, hemos podido determinar que la topografía del soporte en el que se siembran las células madre mesenquimales modula los niveles de factores solubles implicados en la remodelación. Como cabría esperar, la relación OPG/RANKLs es mayor en los medios de cultivo de hOB que en hMSC, células inmaduras que se caracterizan por una mayor expresión de factores resorptivos (Gori, 2000). El cocultivo de hOB y hMSC sembradas en soportes lisos de poliéster o porosos de poliestireno redujo acusadamente la relación OPG/RANKLs, especialmente cuando los ensayos se realizaron en medios de crecimiento. La mayor reducción se detectó en aquellos cocultivos en los que las hMSC se habían sembrado en soportes porosos. Los experimentos mostrados en esta memoria no nos permiten dilucidar si este efecto es atribuible a cambios en la actividad secretora de los hOB. Sin embargo, el descenso en la relación de OPG/RANKLs en cocultivos de hOB y hMSC sembradas sobre soportes porosos en medio de crecimiento se debe principalmente a una disminución en la secreción de OPG, atribuible a los hOB, mientras que cuando el cultivo se realiza en medio osteogénico, dicho

descenso se debe fundamentalmente al aumento de la secreción de RANKLs, atribuible a las hMSC. Los niveles de M-CSF, factor que promueve la maduración de preosteoclastos, incrementaron en los medios de hOB cocultivados con hMSC sembradas sobre soportes porosos. También hemos detectado que los niveles de TGF- $\beta$ 1 disminuyen en la monocapa celular de hOB tras ser cocultivados con hMSC sembradas sobre soportes porosos. En concordancia con nuestras observaciones, estudios previos indican que bajas concentraciones de TGF- $\beta$ 1, implicado en la inhibición de los procesos de reclutamiento y diferenciación de preosteoclastos, conducen a un incremento en la expresión de RANKL y M-CSF en células madre mesenquimales de la médula ósea, mientras que niveles elevados de TGF- $\beta$ 1 estimulan la de OPG (Janssens, 2005; Takai, 1998). En conjunto, estos datos sugieren que la interacción de osteoblastos con células madre mesenquimales sembradas sobre soportes porosos puede inducir localmente la generación de un microambiente rico en factores proresortivos, de forma más pronunciada que cuando han sido sembradas sobre soportes lisos.

Los datos discutidos en este apartado sugieren que tras la implantación del intermediario tisular, las células madre mesenquimales sembradas sobre sustratos con topografías porosas promueven en los osteoblastos la expresión y actividad de genes tempranos que regulan el desarrollo y organización de la matriz mineral, y regulan la producción de factores solubles que inducen la remodelación ósea. En este escenario la inducción de la osteoclastogénesis por parte de células osteoblásticas terminalmente diferenciadas se iniciaría a medida que disminuye la mineralización de la matriz ósea.

#### **4. EFECTO DE LA POROSIDAD DEL MATERIAL EN EL QUE SE CULTIVAN LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE LAS RELACIONES PARACRINAS QUE ESTABLECEN CON OTRAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES**

Las células madre mesenquimales modulan su microambiente a través de la liberación de numerosos factores, tales como SDF-1, IL-6, VEGF u OPG (Meirelles, 2009; Vallés, 2015). Estos factores no solo regulan el comportamiento de otros tipos celulares, como osteoblastos o macrófagos, sino también el de otras células osteoprogenitoras. Diversos estudios *in vitro* indican que las células madre mesenquimales migran hacia estímulos contenidos en medios condicionados por otras células madre mesenquimales (Menon, 2007) y son atraídas por el factor de crecimiento insulínico que, además de por otros tipos celulares, es secretado por células osteoprogenitoras (Meirelles, 2009; Ponte, 2007). Estos estudios sugieren que las células madre mesenquimales sembradas en un material para regeneración tisular podrían, una vez implantadas, modular la actividad de células osteoprogenitoras presentes en el tejido receptor. Sin embargo, se desconoce el efecto que la topografía de los materiales tiene en la

comunicación paracrina que las células madre mesenquimales sembradas sobre estos soportes establecen con células madre mesenquimales adyacentes.

Hemos observado que, en ausencia de contacto directo, las hMSC<sup>S</sup> sembradas en diferentes tipos de soportes establecen interacciones con otras células madre mesenquimales que afectan a la viabilidad de ambas poblaciones. Así, las células madre mesenquimales disminuyen la viabilidad de hMSC<sup>S</sup> sembradas tanto sobre soportes lisos de poliéster como sobre porosos de poliestireno o de Ti64, mientras que ejercen un efecto opuesto sobre células sembradas en hidrogeles de fibrina, estimulando acusadamente su viabilidad. También las hMSC<sup>S</sup> sembradas en los soportes pueden modificar la actividad metabólica de células madre mesenquimales con las que no establecen contacto directo, como indica la disminución detectada cuando se cocultivaron con células adheridas a soportes lisos de poliéster o hidrogeles de fibrina. En cambio, no observamos variación alguna cuando los cocultivos se realizaron empleando soportes porosos de poliestireno o Ti64. Los datos de los que disponemos no nos permiten establecer relación alguna entre la composición química o la topografía del sustrato que alberga las células madre mesenquimales y su influencia sobre la proliferación de células osteoprogenitoras con las que no establecen un contacto directo. Sin embargo, sugieren que tras la implantación de un intermediario tisular, la viabilidad de las células progenitoras adyacentes podría experimentar variaciones significativas en función de la topografía y la composición química del soporte en el que se han sembrado las células madre mesenquimales. Observamos asimismo que las hMSC<sup>S</sup> ejercen efectos paracrinicos sobre la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales con las que no establecen un contacto directo. Así, las hMSC<sup>S</sup> sembradas tanto en soportes lisos de poliéster como porosos de poliestireno ejercen un efecto estimulante sobre la actividad FA de células madre mesenquimales cultivadas en medio que contiene agentes inductores de la maduración osteoblástica, de forma análoga a lo ya observado en cocultivos de osteoblastos. Sin embargo, no se observaron diferencias entre la estimulación de la actividad enzimática de las células madre mesenquimales cocultivadas con hMSC<sup>S</sup> sembradas sobre soportes lisos o porosos, a diferencia de lo observado en los experimentos con osteoblastos. Así, las células osteoprogenitoras parecen menos sensibles que los osteoblastos a la topografía del sustrato que alberga las células madre mesenquimales.

Finalmente, investigamos si la naturaleza del material sobre el que se siembran las hMSC<sup>S</sup> tiene algún efecto sobre el control que estas células pudieran ejercer sobre la capacidad de migración de células mesenquimales con las que no establecen contacto directo. Los datos recogidos en esta memoria indican que únicamente cuando las hMSC<sup>S</sup> han sido sembradas en hidrogeles de fibrina se observa un efecto sobre la migración de células madre

mesenquimales, que disminuye significativamente. Este efecto esté probablemente muy relacionado con la disminución de la viabilidad que experimentan cuando se cocultivan con hMSC<sup>S</sup> sembradas en los hidrogeles. En conjunto, los datos obtenidos sugieren que, tras la implantación de hidrogeles conteniendo células madre mesenquimales, la viabilidad de osteoblastos y células osteoprogenitoras así como la capacidad migratoria de éstas últimas podría disminuir en el tejido adyacente al hidrogel implantado.

## **5. EFECTO DE LA POROSIDAD DEL MATERIAL EN EL QUE SE CULTIVAN LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE LAS RELACIONES PARACRINAS QUE ESTABLECEN CON CÉLULAS ENDOTELIALES**

La interacción entre células osteoprogenitoras y células endoteliales se ha investigado mediante cocultivos en los que ambos tipos celulares establecen contacto directo (Laranjeira, 2012) o, menos frecuentemente, contacto indirecto a través del intercambio de factores solubles (Meury, 2006). También se han realizado experimentos en los que uno de estos tipos celulares se incubaba con medios condicionados procedentes del cultivo del otro tipo celular (Saleh, 2011). Sin embargo, esta última aproximación excluye las interacciones dinámicas que se producen entre ambos tipos celulares. Se ha postulado que las células del linaje osteoblástico y las endoteliales interactúan únicamente a través de su contacto directo (Stahl, 2004), si bien estudios posteriores han detectado efectos en células madre mesenquimales incubadas con medios condicionados procedentes de células endoteliales (Saleh, 2011). Los estudios previos han utilizado células endoteliales de diferentes orígenes tales como células endoteliales dermales, de aorta, de vena safena, de vena del cordón umbilical o células endoteliales progenitoras (Grellier, 2009a). Se ha observado que la respuesta angiogénica varía dependiendo de su grado de diferenciación ya que, por ejemplo, las células endoteliales progenitoras generan un número menor de estructuras vasculares que las células endoteliales de vena del cordón umbilical o de la microvasculatura dermal (Grellier, 2009a). Los experimentos descritos en esta memoria se llevaron a cabo con células endoteliales de vena del cordón umbilical, células HUVEC, capaces de responder a las señales liberadas por células osteoblásticas (Grellier, 2009b; Guillotin, 2008). Por otro lado, los experimentos de cocultivo se realizaron en medio DMEM suplementado únicamente con suero, para favorecer que las células HUVEC respondan a los factores solubles secretados por las hMSC y esta respuesta no se vea alterada por factores exógenos presentes en los medios de cultivo habituales de las células endoteliales, muy ricos en factores de crecimiento. Además, el medio DMEM presenta un alto contenido en glucosa, 25 mM, que favorece la apoptosis de células endoteliales (Ho, 2000). En efecto, las células HUVEC disminuyen su viabilidad al cabo de 7 días de cultivo en

este medio. Sin embargo, el cocultivo con hMSC sembradas tanto en soportes lisos de poliéster como en soportes porosos de poliestireno o de Ti64 incrementó notablemente su actividad metabólica, sugiriendo que las hMSC secretan factores que promueven la supervivencia de las células HUVEC. Existen numerosas evidencias que describen los efectos paracrinicos de las células madre mesenquimales sobre la supervivencia de otros tipos celulares. La incubación con medios condicionados de células madre mesenquimales de tejido adiposo previene la apoptosis de podocitos inducida por altas concentraciones de glucosa (Li, 2013). Además, Hung y col. (2007) observaron que la incubación con medio condicionado de células multipotentes del estroma sometidas a hipoxia activa la ruta PI3K/Akt en células endoteliales de la aorta, disminuyendo su muerte por apoptosis. Curiosamente, las hMSC sembradas en hidrogeles de fibrina no tuvieron efecto alguno sobre la viabilidad de las células HUVEC. Esta observación sugiere que la configuración tridimensional que adquieren las células madre mesenquimales en estos hidrogeles modula la regulación paracrina que ejercen sobre la supervivencia de las células endoteliales.

Durante el proceso de angiogénesis, las células endoteliales proliferan y migran para establecer contacto con células endoteliales vecinas y formar nuevos vasos que restituyan el flujo sanguíneo (Donovan, 2001). Numerosos estudios han observado que la liberación de factores paracrinicos por parte de las hMSC modula la capacidad de migración y formación de estructuras tubulares de las células endoteliales. Por ejemplo, el número y complejidad de estructuras tubulares formadas por células endoteliales progenitoras de rata así como la expresión de genes relacionados con los procesos de migración como VE-cadherinas o PECAM-1 aumenta si se cocultivan en contacto directo con células madre mesenquimales de rata (Aguirre, 2010). De acuerdo a estudios previos realizados con medios condicionados (Potapova, 2007), hemos observado que la migración de células HUVEC cocultivadas en ausencia de contacto directo con hMSC sembradas en soportes lisos de poliéster o porosos de poliestireno y de Ti64 es superior a la de células HUVEC cultivadas aisladamente. Este efecto esté probablemente muy relacionado con el incremento de la viabilidad que experimentan cuando se cocultivan con hMSC sembradas en estos soportes. Cabe destacar que tanto la viabilidad como la capacidad de migración de las HUVEC cocultivadas con hMSC sembradas sobre los soportes porosos fue mayor respecto al cocultivo con hMSC sembradas sobre soportes lisos, sugiriendo que la porosidad modula la secreción de factores, por parte de células madre mesenquimales, implicados en la angiogénesis. De nuevo, el efecto estimulante sobre la migración de células HUVEC no se observó cuando se cocultivaron con hMSC sembradas en hidrogeles de fibrina, sugiriendo que no solo la topografía sino la química de los materiales, que también condiciona la configuración tridimensional que adoptan las células en

los hidrogeles, juega un papel relevante en la secreción de factores solubles por parte de las células madre mesenquimales. Para estudiar la influencia de la porosidad sobre la que se siembran las células madre mesenquimales en el control paracrino que ejercen en la formación de vasos, las células endoteliales se sembraron en Matrigel, una matriz que induce la formación de estructuras tubulares a través de un proceso que imita al que ocurre durante la formación *in vivo* de la microvasculatura (Kleinman, 2005). Los resultados obtenidos indican que las células endoteliales incubadas en medios condicionados que contienen factores secretados por hMSC cultivadas sobre soportes porosos de poliestireno forman estructuras tubulares más grandes que cuando se incuban en medios procedentes de hMSC cultivadas sobre soportes lisos de poliéster. En conjunto, los datos referentes a la proliferación, actividad migratoria y formación de estructuras tubulares de las células endoteliales sugieren que las células mesenquimales cultivadas sobre superficies porosas de poliestireno promueven, de forma paracrina, procesos angiogénicos.

El factor de crecimiento VEGF es un regulador clave de los procesos implicados en la neovascularización de defectos óseos (Carmeliet, 2011; Kaigler, 2006). Numerosos estudios indican que la topografía a la que se adhieren las células mesenquimales juega un papel relevante en la regulación de su secreción. Por ejemplo, datos publicados por nuestro laboratorio indican que las células hMSC secretan mayor cantidad de VEGF cuando son cultivadas sobre superficies rugosas de acero 316 LVM que sobre acero liso (Saldaña, 2014). Dada su relevancia en el comportamiento de células endoteliales, decidimos estudiar en profundidad la expresión de VEGF en sistemas de cocultivo con células madre mesenquimales cultivadas sobre soportes lisos de poliéster y porosos de poliestireno. Detectamos que la secreción de VEGF es mayor en hMSC sembradas en soportes porosos que en lisos y que estos cambios se correlacionaban con variaciones en los niveles de acumulación de ARNm del gen que codifica para VEGF (datos no mostrados). Sorprendentemente, el cocultivo de hMSC sembradas en ambos tipos de soportes con células HUVEC disminuyó drásticamente los niveles de VEGF en el medio, que no pudo ser detectado con el sistema comercial que hemos empleado en este trabajo. Estudios en que los que las células HUVEC se cocultivaron en contacto directo con células osteoprogenitoras ya habían detectado esta importante disminución de la secreción de VEGF (Grellier, 2009b). Además, estos estudios indicaban que la disminución de la secreción de VEGF no estaba mediada por un descenso en la producción de la proteína en las células precursoras, sino que se acompañaba de un incremento de sus niveles intracelulares así como de una mayor expresión de los receptores de VEGF en células HUVEC. También Li y col. (2011) detectaron este aumento en la expresión de VEGF en células de médula ósea cocultivadas en contacto directo con HUVEC, además de un aumento en la



expresión del receptor de VEGF, KDR, en las células endoteliales cocultivadas. Para averiguar si en ausencia de contacto directo las células endoteliales estaban provocando un descenso en la producción de VEGF por parte de las células madre mesenquimales, que explicase la brusca disminución de VEGF en el medio, estudiamos sus niveles intracelulares. Observamos que el cocultivo con HUVEC no produce variaciones significativas en los niveles intracelulares de VEGF de hMSC sembradas sobre soportes lisos, e incluso los incrementa cuando las hMSC están sembradas sobre soportes porosos, datos que correlacionan con cambios en la acumulación del ARNm del gen que codifica para VEGF (datos no mostrados). Se ha postulado que el VEGF secretado por las células osteoprogenitoras es internalizado rápidamente por las células HUVEC, contribuyendo a su disminución en el espacio extracelular. Aunque este mecanismo no puede ser excluido, las pequeñas variaciones en los niveles del factor en la monocapa de células HUVEC no indican que el descenso en los niveles de VEGF en el medio se explique a través de su reclutamiento por la matriz de las células endoteliales cocultivadas con hMSC. Dado que el VEGF se está expresando en células osteoprogenitoras tanto a nivel de ARNm como proteico pero no se detecta en el medio extracelular, hipotetizamos que podría estar secuestrado por algún factor secretado por las células endoteliales. Por ello, se investigaron los niveles del receptor soluble de VEGF, Flt-1, en los medios de cultivos de células HUVEC cocultivadas o no con hMSC sembradas en los soportes lisos o porosos. Flt-1 bloquea la actividad de VEGF impidiendo su unión a los receptores de membrana. La secreción de Flt-1 incrementa notablemente en cultivos de células HUVEC sometidas a condiciones de estrés tales como hipoxia, reducción de suero o falta de nutrientes, como parte de un mecanismo que asegura la supervivencia celular a través del bloqueo de la estimulación de la proliferación que media VEGF (Latham, 2012). En concordancia con lo observado en nuestros experimentos de viabilidad, la secreción de Flt-1 es muy elevada en cultivos aislados de HUVEC y disminuye notablemente cuando se cocultivan con hMSC sembradas tanto en soportes lisos como porosos. Dado que la concentración de Flt-1 en los cultivos y cocultivos en que las células HUVEC están presentes es de unos tres órdenes de magnitud superior a la de VEGF, es razonable que no haya sido posible detectar este factor por estar unido al receptor Flt-1 soluble. En conjunto, estos datos indican que los efectos estimulantes sobre la viabilidad, formación de estructuras tubulares y migración de células endoteliales que, en ausencia de contacto directo, ejercen las células mesenquimales sembradas en soportes porosos sobre las células endoteliales no están mediados por VEGF. La secreción de VEGF por parte de las células madre mesenquimales es objeto de un estrecho control por parte de las células endoteliales a través de la secreción de Flt-1, que no parece estar modulado por la porosidad del soporte en el que se han sembrado las células mesenquimales.

Algunos estudios han examinado la influencia de las células endoteliales sobre el comportamiento de células mesenquimales. Por ejemplo, se ha detectado que la proliferación de células madre mesenquimales aumenta tras cultivarlas en contacto directo con células endoteliales o incubarlas con medios procedentes de este tipo celular (Bidarra, 2011; Saleh, 2011). Sin embargo, la viabilidad de hMSC sembradas sobre soportes lisos de poliéster y porosos de poliestireno o de Ti64 no sufrió cambios tras el cocultivo con células HUVEC en ausencia de contacto directo, e incluso disminuyó cuando las células habían sido sembradas en hidrogeles de fibrina. Otros estudios indican que las células endoteliales regulan de forma paracrina la maduración de células osteoprogenitoras mediante la secreción de diferentes factores solubles, como la proteína morfogenética ósea BMP-2 (Wang, 2011). Por ejemplo, las células hMSC cultivadas en medios condicionados de células HUVEC experimentan un aumento en la expresión de FA, osteopontina, osteocalcina y osteonectina (Saleh, 2011). Los datos recogidos en esta memoria indican que las células endoteliales pueden modular la diferenciación de células osteoprogenitoras en ausencia de contacto directo. Así, la actividad FA de las hMSC sembradas en soportes porosos de poliestireno incrementó cuando se cocultivaron con células HUVEC. Este efecto no se observó cuando las células hMSC se incubaron sobre soportes lisos de poliéster, indicando que las características estructurales de los soportes para ingeniería tisular sobre los que se siembran las células madre mesenquimales probablemente juegan un papel determinante en el control que ejercen las células endoteliales sobre la diferenciación osteoblástica.

## ***CONCLUSIONES***



De todo lo anteriormente expuesto se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La aleación Ti6Al4V tratada mediante percusión con láser presenta una capa superficial de rugosidad submicrométrica que contiene TiO metaestable, y en su zona más externa, Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y AlOH. En función de la densidad de pulsos láser empleada, el tratamiento conduce a la aparición de rutilo en dicha capa superficial. Estas especies químicas no se detectan en la aleación sin tratar. Las aleaciones percutidas con láser permiten la adhesión de células del linaje osteoblástico a través de mecanismos independientes de la formación de adhesiones focales que contienen paxilina o p-FAK Y397. Las aleaciones tratadas permiten la proliferación de células del linaje osteoblástico y la formación de matriz extracelular de forma similar que la aleación sin tratar y favorecen tanto la maduración osteogénica de células madre mesenquimales como la formación de una matriz mineralizada por parte de osteoblastos.
2. Las características químicas y topográficas de los materiales en los que se siembran las células madre mesenquimales juegan un papel relevante en la relación paracrina que estas células establecen con osteoblastos, células madre mesenquimales y células endoteliales con las que no establecen contacto directo así como en la respuesta de las células madre mesenquimales a factores solubles secretados por osteoblastos, células madre mesenquimales y células endoteliales.
3. Las características de los soportes en los que se siembran las células madre mesenquimales modulan el control paracrino que estas células ejercen sobre la organización de la matriz ósea por parte de los osteoblastos así como sobre la producción de factores implicados en la remodelación ósea.
4. Las características de los soportes en los que se siembran las células madre mesenquimales juegan un papel relevante en el control paracrino que estas células ejercen sobre la supervivencia y la capacidad de migración y formación de estructuras tubulares de células endoteliales.



## ***BIBLIOGRAFÍA***





- Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem.* 2007, 282(21): 15872-15883.
- Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, 400(2): 284-291
- Altenberger I, Nalla RK, Sano Y, Wagner L, Ritchie RO. On the effect of deep-rolling and laser-peening on the stress-controlled low- and high-cycle fatigue behavior of Ti-6Al-4V at elevated temperatures up to 550 degrees C. *Int. J. Fatigue* 2012, 44:292-302.
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012, 40(5): 363-408.
- Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008, 20(2): 86-100.
- Askari JA, Buckley PA, Mould AP, Humphries MJ. Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci.* 2009, 122 (Pt 2): 165-170.
- Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.* 1998; 76(6): 899-910.
- Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells Barranco V, Escudero ML, García-Alonso MC. 3D, chemical and electrochemical characterization of blasted Ti6Al4V surfaces: its influence on the corrosion behaviour. *Electrochim. Acta* 2007, 52:4374-4384.
- Barranco V, Escudero ML, García-Alonso MC. Influence of the microstructure and topography on the barrier properties of oxide scales generated on blasted Ti6Al4V surfaces. *Acta Biomater.* 2011, 7:2716-2725.
- Barranco V, Onofre E, Escudero ML, García-Alonso MC. Characterization of roughness and pitting corrosion of surfaces modified by blasting and thermal oxidation. *Surf. Coat. Technol.* 2010, 204:3783–3793.

- Baxmann M, Jauch SY, Schilling C, Blömer W, Grupp TM, Morlock MM. The influence of contact conditions and micromotions on the fretting behavior of modular titanium alloy taper connections. *Med Eng Phys.* 2013, 35:676-683.
- Berner A, Reichert JC, Müller MB, Zellner J, Pfeifer C, Dienstknecht T, Nerlich M, Sommerville S, Dickinson IC, Schütz MA, Füchtmeier B. Treatment of long bone defects and non-unions: from research to clinical practice. *Cell Tissue Res.* 2012, 347(3): 501-519.
- Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol.* 2007, 213(3): 565-573.
- Bidarra SJ, Barrias CC, Barbosa MA, Soares R, Amédée J, Granja PL. Phenotypic and proliferative modulation of human mesenchymal stem cells via crosstalk with endothelial cells. *Stem Cell Res.* 2011, 7(3): 186-197.
- Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater.* 2012, 23: 13-27.
- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011, 26(2): 229-238.
- Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducky P, and Karsenty G. 1998. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone.* 1998, 23:187–196
- Boyle W, Scott Simonet W, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003, 423: 337-342.
- Browne M, Gregson PJ. Surface modification of titanium alloy implants. *Biomaterials.* 1994; 15:894–898.
- Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1998, 16(2): 155-162.

- Bryers JD, Giachelli CM, Ratner BD. Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts. *Biotechnol Bioeng*. 2012, 109(8): 1898-1911.
- Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000, 21(23): 2347-2359.
- Burra S, Nicolella DP, Francis WL, Freitas CJ, Mueschke NJ, Poole K, Jiang JX. Dendritic processes of osteocytes are mechanotransducers that induce the opening of hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(31): 13648-13653.
- Calzado-Martín A, Crespo L, Saldaña L, Boré A, Gómez-Barrena E, Vilaboa N. Human bone-lineage cell responses to anisotropic Ti6Al4V surfaces are dependent on their maturation state. *J Biomed Mater Res A*. 2014, 102(9): 3154-3166.
- Calzado-Martín A, Méndez-Vilas A, Multigner M, Saldaña L, González-Carrasco JL, González-Martín ML, Vilaboa N. On the role of RhoA/ROCK signaling in contact guidance of bone-forming cells on anisotropic Ti6Al4V surfaces. *Acta Biomater*. 2011, 7(4): 1890-1901
- Cameron JA, Milner DJ, Lee JS, Cheng J, Fang NX, Jasiuk IM. Employing the biology of successful fracture repair to heal critical size bone defects. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013, 367: 113-132.
- Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014, doi: 10.1016/j.abb.2014.05.003
- Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011, 473: 298-307.
- Carreón H, Barriuso S, Porro JA, González-Carrasco JL, Ocana JL. Thermoelectric assessment of laser peening induced effects on a metallic biomedical Ti6Al4V. *Frontiers in ultrafast optics: biomedical, scientific and industrial applications XIV. Proceedings of SPIE*. 2014, 8972: 89721Q.

- Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JC, Helgerson S, Tawil B. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng.* 2006, 12(8): 2385-2396.
- Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz JP. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys J.* 2007, 92(8): 2964-2974.
- Chao J, López V. Failure analysis of a Ti6Al4V cementless HIP prosthesis. *Eng Fail Anal* 2007, 14:822–830.
- Clauer AH. Laser shock peening for fatigue resistance. *Surface Performance of Titanium*, J. K. Gregory, H. J. Rack, and D. Eylon (eds.) TMS, Warrendale, PA. 1996, 217-30.
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008, 61:577-587
- Donovan D, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis.* 2001; 4(2): 113-121.
- Fan H, Guan JL. Compensatory function of Pyk2 protein in the promotion of focal adhesion kinase (FAK)-null mammary cancer stem cell tumorigenicity and metastatic activity. *J Biol Chem.* 2011, 286(21): 18573-18582.
- Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta.* 2009, 1790(6): 431-44.
- García-Alonso MC, Saldaña L, Vallés G, González-Carrasco JL, González-Cabrero J, Martínez ME, Gil-Garay E, Munuera L. In vitro corrosion behaviour and osteoblast response of thermally oxidised Ti6Al4V alloy. *Biomaterials.* 2003, 24(1): 19-26.
- Gasperini L, Mano JF, Reis RL. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J R Soc Interface.* 2014, 11(100): 20140817

- Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Prog Mater Sci.* 2009, 54(3): 397-425
- Ghatak S, Morgner J, Wickström SA. ILK: a pseudokinase with a unique function in the integrin-actin linkage. *Biochem Soc Trans.* 2013, 41(4): 995-1001.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999, 285(5430): 1028-1032.
- Gilmore AP, Romer LH. Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. *Mol Biol Cell.* 1996, 7(8): 1209-1224.
- Gittens RA, McLachlan T, Olivares-Navarrete R, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials.* 2011, 32(13):3395-3403.
- Goodman SB, Gómez-Barrena E, Takagi M, Konttinen YT. Biocompatibility of total joint replacements: A review. *J Biomed Mater Res A.* 2009, 90(2): 603-618.
- Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology.* 2000, 141(12): 4768-4776.
- Grellier M, Bordenave L, Amédée J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2009, 27(10): 562-571<sup>A</sup>.
- Grellier M, Ferreira-Tojais N, Bourget C, Bareille R, Guillemot F, Amédée J. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells. *J Cell Biochem.* 2009, 106(3): 390-398<sup>B</sup>.

- Guida L, Oliva A, Basile MA, Giordano M, Nastri L, Annunziata M. Human gingival fibroblast functions are stimulated by oxidized nano-structured titanium surfaces. *J Dent.* 2013, 41(10): 900-907.
- Guillotin B, Bareille R, Bourget C, Bordenave L, Amédée J. Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone.* 2008, 42(6): 1080-1091.
- Guntur AR, Rosen CJ. Bone as an endocrine organ. *Endocr Pract.* 2012, 18(5): 758-762
- Guo YB, Caslaru R. Fabrication and characterization of micro dent arrays produced by laser shock peening on titanium Ti-6Al-4V surfaces *J. Mater. Process. Tech.* 2011, 211:729-736.
- Hamilton DW, Brunette DM. The effect of substratum topography on osteoblast adhesion mediated signal transduction and phosphorylation. *Biomaterials.* 2007, 28(10): 1806-1819.
- Harvey AG, Hill EW, Bayat A. Designing implant surface topography for improved biocompatibility. *Expert Rev Med Devices.* 2013, 10(2): 257-267.
- Heino TJ, Hentunen TA, Väänänen HK. Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. *J Cell Biochem.* 2002, 85(1): 185-197.
- Ho FM, Liu SH, Liao CS, Huang PJ, Lin-Shiau SY. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation.* 2000, 101(22): 2618-2624.
- Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells.* 2007, 25(9): 2363-2370.

- Ilmer M, Karow M, Geissler C, Jochum M, Neth P. Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2009, 15(9): 2397-2409
- Janmey PA, Winer JP, Weisel JW. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J R Soc Interface*. 2009, 6(30): 1-10.
- Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 to the bone. *Endocr Rev*. 2005, 26: 743-774.
- Katti KS. Biomaterials in total joint replacement. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2004, 39(3): 133-142.
- Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res*. 2006, 21(5): 735-744.
- Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials*. 2004, 25(28): 5947-5954.
- Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(11):4872-4877.
- Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*. 2005, 15(5): 378-386.
- Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol*. 2004, 15(5): 1113-1125.
- Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*. 2012, 45(12): 863-873.

- Laranjeira MS, Fernandes MH, Monteiro FJ. Reciprocal induction of human dermal microvascular endothelial cells and human mesenchymal stem cells: time-dependent profile in a co-culture system. *Cell Prolif.* 2012, 45: 320-334.
- Latham AM, Odell AF, Mughal NA, Issitt T, Ulyatt C, Walker JH, Homer-Vanniasinkam S, Ponnambalam S. A biphasic endothelial stress-survival mechanism regulates the cellular response to vascular endothelial growth factor A. *Exp Cell Res.* 2012, 318(18): 2297-2311.
- Li H, Daculsi R, Grellier M, Bareille R, Bourget C, Remy M, Amedee J. The role of vascular actors in two dimensional dialogue of human bone marrow stromal cell and endothelial cell for inducing self-assembled network. *PLoS One.* 2011, 6(2): e16767.
- Li D, Wang N, Zhang L, Hanyu Z, Xueyuan B, Fu B, Shaoyuan C, Zhang W, Xuefeng S, Li R, Chen X. Mesenchymal stem cells protect podocytes induced by high glucose via secretion of epithelial growth factor. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 4(5):103.
- Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J.* 1995;15: 118-140.
- Lim JY, Dreiss AD, Zhou Z, Hansen JC, Siedlecki CA, Hengstebeck RW, Cheng J, Winograd N, Donahue HJ. The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. *Biomaterials.* 2007 (B), 28(10): 1787-1797<sup>B</sup>
- Lim Y, Park H, Jeon J, Han I, Kim J, Jho EH, Oh ES. Focal adhesion kinase is negatively regulated by phosphorylation at tyrosine 407. *J Biol Chem.* 2007, 282(14): 10398-10404<sup>A</sup>
- Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mat Sci Eng R.* 2004, 47: 49–121.
- Lu Z, Wang G, Roohani-Esfahani I, Dunstan CR, Zreiqat H. Baghdadite ceramics modulate the cross talk between human adipose stem cells and osteoblasts for bone regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2014; 20(5-6): 992-1002.



- Lüthen F, Lange R, Becker P, Rychly J, Beck U, Nebe JG. The influence of surface roughness of titanium on beta1- and beta3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. *Biomaterials*. 2005, 26(15): 2423-2440.
- Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, Costa H, Cañones C, Raiden S, Vermeulen M, Geffner JR. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*. 2010, 5(2): e9252.
- Magnissalis EA, Zinelis S, Karachalios T, Hartofilakidis G. Failure analysis of two Ti-alloy total hip arthroplasty femoral stems fractured in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2003, 66: 299-305.
- Mallick KK, Cox SC. Biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013, 5: 341-60.
- Meirelles LS, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009, 20(5-6): 419-427.
- Menon LG, Picinich S, Koneru R, Gao H, Lin SY, Koneru M, Mayer-Kuckuk P, Glod J, Banerjee D. Differential gene expression as associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem Cells*. 2007, 25(2): 520-528.
- Meury T, Verrier S, Alini M. Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem*. 2006, 98(4): 992-1006.
- Montross CS, Wei T, Ye L, Clark G, Mai YW. Laser shock processing and its effects on microstructure and properties of metal alloys: a review. 2002. *Int J Fatigue*. 2002, 24: 1021-1036

- Nalla RK, Altenberger I, Noster U, Liu GY, Scholtes B, Ritchie RO. On the influence of mechanical surface treatments-deep rolling and laser shock peening-on the fatigue behavior of Ti/6Al/4V at ambient and elevated temperatures. *Mater. Sci. Eng. A* 2003, 355:216-230.
- Oates CJ, Wen W and Hamilton DW. Role of Titanium Surface Topography and Surface Wettability on Focal Adhesion Kinase Mediated Signaling in Fibroblasts. *Materials*. 2011, 4: 893-907.
- Okumura A, Goto M, Goto T, Yoshinari M, Masuko S, Katsuki T, Tanaka T. Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (Saos-2). *Biomaterials*. 2001, 22(16): 2263-2271.
- Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*. 2010, 77(1): 4-12.
- Park KH, Kim H, Moon S, Na K. Bone morphogenic protein-2 (BMP-2 loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrinhydrogel for bone tissue engineering. *J Biosci Bioeng*. 2009, 108(6): 530-537.
- Pilia M, Guda T, Appleford M. Development of composite scaffolds for load-bearing segmental bone defects. *Biomed Res Int*. 2013, 2013: 458253
- Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Hérault O, Charbord P, Domenech J. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells*. 2007, 25(7): 1737-1745.
- Potapova IA, Gaudette GR, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, Doronin SV. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2007, 25(7): 1761-1768.

- Proksch S, Steinberg T, Stampf S, Schwarz U, Hellwig E, Tomakidi P. Crosstalk on cell behavior in interactive cocultures of hMSCs with various oral cell types. *Tissue Eng Part A*. 2012, 18(23-24): 2601-2610.
- Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010, 285(33): 25103-25108.
- Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006, 27(18): 3413-3431.
- Riancho JA, Gutiérrez GE. Factores Reguladores de la Resorción Ósea. *Rev Metab Oseo Min*. 2003, 1(2): 51-66.
- Rowin ME, Whatley RE, Yednock T, Bohnsack JF. Integrin calcium requirements for beta1 integrin activation. *J Cell Physiol*. 1998, 175(2): 193-202.
- Saldaña L, Barranco V, González-Carrasco JL, Rodríguez M, Munuera L, Vilaboa N. Thermal oxidation enhances early interactions between human osteoblasts and alumina blasted Ti6Al4V alloy. *J Biomed Mater Res A*. 2007, 81(2): 334-346.
- Saldaña L, Crespo L, Bensiamar F, Arruebo M, Vilaboa N. Mechanical forces regulate stem cell response to surfaces topography. *J Biomed Mater Res Part A*. 2014, 102(A): 128–140.
- Saldaña L, González-Carrasco JL, Rodríguez M, Munuera L, Vilaboa N. Osteoblast response to plasma-spray porous Ti6Al4V coating on substrates of identical alloy. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 77(3): 608-617.
- Saldaña L, Vilaboa N. Effects of micrometric titanium particles on osteoblast attachment and cytoskeleton architecture. *Acta Biomater*. 2010, 6(4): 1649-1660.
- Saldaña L, Vilaboa N, Vallés G, González-Cabrero J, Munuera L. Osteoblast response to thermally oxidized Ti6Al4V alloy. *J Biomed Mater Res A*. 2005, 73(1): 97-107.

- Saleh F, Whyte M, Ashton P, Genever PG. Regulation of mesenchymal stem cell activity by endothelial cells. *Stem Cells Dev.* 2011, 20: 391-
- Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys.* 2014, 561:109-117.
- Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008, 19(5): 459-466.
- Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2004, 1692(2-3): 77-102.
- Shaikh FM, Callanan A, Kavanagh EG, Burke PE, Grace PA, McGloughlin TM. Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs.* 2008, 188(4): 333-346.
- Shemtov-Yona K, Rittel D. Identification of failure mechanisms in retrieved fractured dental implants. *Eng Fail. Anal.* 2014, 3858–3865
- Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials.* 2001, 22(19): 2581-2593.
- Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port.* 2011, 36(3): 209-218
- Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int.* 2013, 2013:130763.
- Song Y, Ju Y, Song G, Morita Y. In vitro proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on nanoporous alumina. *Int J Nanomedicine.* 2013, 8: 2745-2756.

- Stahl A, Wenger A, Weber H, Stark GB, Augustin HG, Finkenzeller G. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 322(2): 684-692.
- Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater. Today.* 2008, 11(5): 18-25.
- Sugita Y, Ishizaki K, Iwasa F, Ueno T, Minamikawa H, Yamada M, Suzuki T, Ogawa T. Effects of pico-to-nanometer-thin TiO<sub>2</sub> coating on the biological properties of microroughened titanium. *Biomaterials.* 2011, 32(33): 8374-8384.
- Sun J, Zhou H, Deng Y, Zhang Y, Gu P, Ge S, Fan X. Conditioned medium from bone marrow mesenchymal stem cells transiently retards osteoblast differentiation by downregulating runx2. *Cells Tissues Organs.* 2012, 196(6): 510-522.
- Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y. Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem.* 1998, 273(42): 27091-27096.
- Teo GS, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, Sciuto TE, Dvorak AM, Karp JM, Carman CV. Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells.* 2012, 30(11): 2472-2486.
- Tsai MT, Lin DJ, Huang S, Lin HT, Chang WH. Osteogenic differentiation is synergistically influenced by osteoinductive treatment and direct cell-cell contact between murine osteoblasts and mesenchymal stem cells. *Int Orthop.* 2012, 36(1): 199-205.
- Vallés G, Bensiamar F, Crespo L, Arruebo M, Vilaboa N, Saldaña L. Topographical cues regulate the crosstalk between MSCs and macrophages. *Biomaterials.* 2015, 37C: 124-133. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.028

- Van der Stok J, Van der Jagt OP, Amin Yavari S, De Haas MF, Waarsing JH, Jahr H, Van Lieshout EM, Patka P, Verhaar JA, Zadpoor AA, Weinans H. Selective laser melting-produced porous titanium scaffolds regenerate bone in critical size cortical bone defects. *J Orthop Res*. 2013, 31(5): 792-799.
- Ventre M, Causa F, Netti PA. Determinants of cell-material crosstalk at the interface: towards engineering of cell instructive materials. *J R Soc Interface*. 2012, 9(74): 2017-2032.
- Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol*. 2006, 24: 33-63.
- Wang J, Ye Y, Tian H, Yang S, Jin X, Tong W, Zhang Y. In vitro osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011, 412(1): 143-149.
- Wang W, Zhao L, Wu K, Ma Q, Mei S, Chu PK, Wang Q, Zhang Y. The role of integrin-linked kinase/ $\beta$ -catenin pathway in the enhanced MG63 differentiation by micro/nano-textured topography. *Biomaterials*. 2013, 34(3): 631-640.
- Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N. New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Orthop*. 2012, 3: 175-181.
- Yamodo IH, Blystone SD. Calcium integrin binding protein associates with integrins  $\alpha V\beta 3$  and  $\alpha IIb\beta 3$  independent of  $\beta 3$  activation motifs. *Cellbio (Irvine, Calif)*. 2012, 1(2): 30-37.
- Yellowley C. CXCL12/CXCR4 signaling and other recruitment and homing pathways in fracture repair. *Bonekey Rep*. 2013, 2: 300.
- Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Müller R, Griffith LG. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation and matrix deposition. *Tissue Eng*. 2001, 7(5): 557-572.

- Zhang W, Li Z, Huang Q, Xu L, Li J, Jin Y, Wang G, Liu X, Jiang X. Effects of a hybrid micro/nanorod topography-modified titanium on adhesion and osteogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 257-265.





## ***APÉNDICE***



Durante el periodo de realización de esta Tesis Doctoral se ha participado en la realización de los siguientes trabajos:

- Rodríguez-Cano A, Cintas P, Fernández-Calderón MC, Pacha-Olivenza MA, **Crespo L**, Saldaña L, Vilaboa N, González-Martín ML, Babiano, R. The quest for reproducible silanization-amination and conjugation reactions on the Ti6Al4V surface. Biocompatibility assessment for medical implants. *Colloid Surfaces B*, 2013, 106: 248-257.
- Saldaña L, **Crespo L**, Bensiamar F, Arruebo M, Vilaboa N. Stem cells response to mechanical stress is dependent on surface microtopography. *J Biomed Mater Res Part A*. 2014, 102(A): 128–140.
- \*Calzado-Martín A., **\*Crespo L.**, Boré A., Gómez-Barrena E., Saldaña L., Vilaboa N (\*first authors). Human bone-lineage cell responses to anisotropic Ti6Al4V surfaces are dependent on their maturation state. *J Biomed Mater Res. Part A*. 2014, 102A: 3154–3166.
- Vallés G, Bensiamar F, **Crespo L**, Arruebo M, Vilaboa N, Saldaña L. Topographical cues regulate the crosstalk between MSCs and macrophages. *Biomaterials*. 2015; 37: 124-133. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.028



